Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DIE EIGNUNG VERSCHIEDENER EXPERIMENTELLER MODELLE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER INTESTINALEN RESORPTION UND METABOLISIERUNG VON ÄTHINYLÖTRADIOL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)

der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jutta Carmen Schiemenz
aus Cottbus

1983

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DIE EIGNUNG VERSCHIEDENER EXPERIMENTELLER MODELLE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER INTESTINALEN RESORPTION UND METABOLISIERUNG VON ÄTHINYLÖTRADIOL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)

der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jutta Carmen Schiemenz
aus Cottbus

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. rer.nat. Dr. med. H. Ritter
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. H. Bolt
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. H.P. Hoensch

M E I N E N E L T E R N

I N D A N K B A R K E I T

G E W I D M E T

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1. 1.	Äthinylöstradiol in der Therapie	1
1. 2.	Metabolisierung von Äthinyl-östradiol in der Leber	1
1. 3.	Wird Äthinylöstradiol im Darm metabolisiert?	2
1. 4.	Problematik des experimentellen Modells	4
1. 5.	Ziel der Arbeit	5
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2. 1.	Material	7
2. 1. 1.	Radioaktive Substanzen	7
2. 1. 2.	Chemikalien	7
2. 1. 3.	Tiere	8
2. 2.	Methoden	8
2. 2. 1.	Versuchsdurchführung	8
2. 2. 1. 1.	Ganztier, isolierte Darmschlinge	8
2. 2. 1. 2.	Darmsäcke a) nicht umgestülpt b) umgestülpt	10 11
2. 2. 1. 3.	Darmstücke	11
2. 2. 1. 4.	Darmhomogenat	12
2. 2. 1. 5.	Darmzellen	16
2. 2. 2.	Analysen	17
2. 2. 2. 1.	Behandlung der Proben	17
2. 2. 2. 2.	Extraktion	17
2. 2. 2. 3.	Dünnschichtchromatographie	18
2. 2. 2. 4.	Enzymbehandlung	18
2. 2. 2. 5.	Säulenchromatographie	19
2. 2. 2. 6.	Bestimmung von freigesetztem ^3H_2O	19
2. 2. 2. 7.	Proteinbestimmung	20
2. 2. 2. 8.	Szintillationszählung	20
2. 2. 3.	Präsentation der Daten	20

		Seite
3.	ERGEBNISSE	
3. 1.	Ganztier	22
3. 1. 1.	Resorption in der isolierten Darmschlinge	22
3. 1. 1. 1.	Abhängigkeit von der Durchblutung	22
3. 1. 1. 2.	Erscheinen der Radioaktivität in Lymphe und Galle	22
3. 1. 1. 3.	Konzentrationsabhängigkeit	23
3. 1. 1. 4.	Resorption von Wasser und Methylglukose	23
3. 1. 2.	Metabolismus in der isolierten Darmschlinge	28
3. 1. 2. 1.	Metabolismus am Steroidgerüst	28
3. 1. 2. 2.	Intestinale Konjugation von Äthinylöstradiol	30
3. 1. 2. 2. 1.	Metabolitenmuster in der isolierten Darmschlinge	30
3. 1. 2. 2. 2.	Metabolitenmuster in der perfundierten Darmschlinge	31
3. 1. 2. 2. 3.	Dekonjugation von Äthinylöstradiol-Glukuronid	35
3. 1. 2. 2. 4.	Konjugation in Abhängigkeit von der Magenentfernung	35
3. 1. 2. 2. 5.	Konjugation in Abhängigkeit von der Äthinylöstradiolkonzentration	37
3. 2.	Isolierter Darmsack	37
3. 2. 1.	Resorption und Konjugation im isolierten Darmsack	37
3. 2. 2.	Resorption und Konjugation am umgestülpten Darmsack	40
3. 2. 3.	Resorption und Konjugation von Äthinylöstradiolglukuronid am umgestülpten Darmsack	43
3. 3.	Isolierte Darmstücke	43
3. 4.	Darmhomogenat	48
3. 4. 1.	Abhängigkeit von der Darmhomogenatmenge	48
3. 4. 2.	Glukuronidierung in Lebermikrosomen	48
3. 4. 3.	Einfluß von Saccharolacton und Trypsininhibitor	48

		Seite
3. 4. 4.	Abhängigkeit von der Äthinyköstradiolkonzentration	51
3. 4. 5.	Abhängigkeit der Glukuronidierungsrate von der Magenentfernung	51
3. 5.	Konjugation in isolierten Darmzellen	54
4.	DISKUSSION	57
4. 1.	Gibt es einen intestinalen "first pass effect" von Äthinylöstradiol?	57
4. 2.	Ist ein enterohepatischer Kreislauf von Äthinylöstradiolglukuronid möglich?	61
4. 3.	Warum folgt Äthinylöstradiol nicht einer normalen Kinetik?	63
4. 4.	Welches experimentelle Modell eignet sich für Studien der intestinalen Resorption und Metabolisierung?	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72

1. EINLEITUNG

1. 1. Äthinylöstradiol in der Therapie

Äthinylöstradiol wird als synthetisches Östrogen seit 1938 in der Therapie verwendet. Es unterscheidet sich von Östradiol durch eine Äthinylgruppe am C_{17}, und seine orale Wirksamkeit ist beim Menschen mehrere hundert mal größer, als die orale Wirksamkeit von Östradiol (1). Die wichtigsten therapeutischen Anwendungsbereiche von Äthinylöstradiol liegen in der Östrogensubstitution nach Ovarektomie, in der Menopause und Postmenopause, sowie in der Kontrazeption. Äthinylöstradiol ist in den meisten Kontrazeptiva in Mengen zwischen 30ug und 50ug enthalten (2), und verhindert den Eisprung durch regulative Erniedrigung der hypophysären Peptidsexualhormone im Plasma (3).

Im Jahre 1973 lag der Marktanteil der hormonellen Kontrazeptiva in der BRD bei 2,8%. Dies entsprach einem Umsatz von 137 Mill. DM. In der DDR lag der Marktanteil sogar bei 15% und der Umsatz bei 217 Mill. DM. (4). Aus diesen Zahlen läßt sich annähernd berechnen, daß jede 20.te Frau im gebärfähigen Alter in der BRD Kontrazeptiva und damit Äthinylöstradiol regelmäßig zu sich nimmt. Damit wird eine große volkswirtschaftliche und medizinische Bedeutung von Äthinylöstradiol deutlich.

1. 2. Metabolisierung von Äthinylöstradiol in der Leber

Äthinylöstradiol wird durch Acetylierung in Ammoniak aus Östron chemisch synthetisiert (5). Der biologische Metabolismus von Äthinylöstradiol in der Leber ist gut untersucht worden und unterscheidet sich ganz wesentlich vom Metabolismus von Östradiol: durch die Einführung der Äthin-Gruppe am C_{17} nämlich, kann Äthinylöstradiol nicht mehr zu der entsprechenden Ketoverbindung oxydiert werden. Außerdem verhindert die voluminöse Äthin-Gruppe sterisch die Hydroxylierung am C_{16}, die zum Äthinylöstradiol führen

würde. Damit sind beim Äthinylöstradiol die beiden wichtigsten metabolischen Schritte, die beim Östradiol zur Inaktivierung des Hormons führen, ausgeschlossen. Andere metabolische Wege werden eingeschlagen: In der Leber steht die Hydroxylierung an 2-Stellung, vermutlich mit einem Epoxid als Zwischenprodukt, im Vordergrund (6). Auch die 4-Stellung kann in geringem Ausmaße hydroxyliert werden. Andere metabolische Schritte spielen eine untergeordnete Rolle. Sie sind in Übersichtstabellen von Hilton und Goldzieher (7), sowie Bolt (8) zusammengefaßt. Äthinylöstradiol und seine Metabolite werden in der Leber rasch konjugiert. Daher sind die Plasmaspiegel an Konjugaten etwa 10x höher als der Plasmaspiegel an freiem Äthinylöstradiol (9). Konjugate werden von der Laber auch in die Galle abgegeben. Ein Teil unterliegt dem entero-hepatischen Kreislauf, ein weiterer Teil wird mit dem Urin ausgeschieden. Beim Menschen liegt das Verhältnis von renaler zu fäkaler Ausscheidung bei 6/4. Die Halbwertszeit von Äthinylöstradiol ist mindestens 10 x länger (8), als die Halbwertszeit natürlicher Östrogene (1).

Während nun also viel über den hepatischen Metabolismus und die Pharmakokinetik von Äthinylöstradiol bekannt ist, liegt über die intestinale Metabolisierung nur ein kürzlich erschienene Untersuchung zur Glukuronidierung im Darmsack vor (10). Über intestinale Resorption und intestinalen Metabolismus am Ganztier ist nichts bekannt.

1. 3. Wird Äthinylöstradiol im Darm metabolisiert?

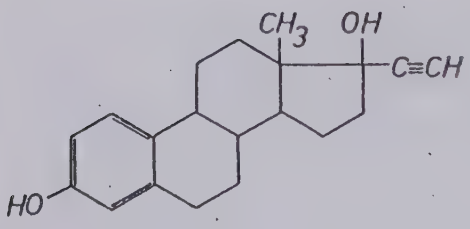
In den letzten Jahren ist man zunehmend zu der Erkenntnis gelangt, daß dem Darm eine ähnliche metabolische Funktion zukommen könnte, wie der Leber. Die Aktivität der 7-Äthoxikumarin-o-desalkylierung ist im Dünndarm nur 10 x geringer als in der Leber (11). Die Mucosazelle ist auch in der Lage zu konjugieren. 1-Naphthol wird bei der Resorption größtenteils glukuronidiert (12). Ein Überblick über

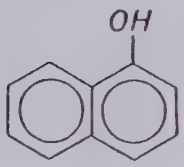
den Fremdstoffmetabolismus im Darm wurde von Hartiala gegeben (13).

In Bezug auf das Äthinylöstradiol interessierte uns nun die Frage, ob dieses Östrogen bei der Resorption im Darm metabolisiert wird, da ein möglicher Metabolismus sich auf die Bioverfügbarkeit und die Pharmakokinetik dieser Substanz auswirken könnte. Falls bereits im Darm, wie in der Leber, eine 2-Hydroxylierung stattfände, würde dies einerseits zu einem hormonell inaktiven Metaboliten führen, andererseits führt die 2-Hydroxylierung von Äthinylöstradiol zu reaktiven Zwischenprodukten, die kovalent an biologische Makromoleküle der Zelle gebunden werden können (14). Die Aktivierung über Epoxide bedeutet, nach dem heutigen Stand der Kenntnis, ein erhöhtes Risiko der Entartung für das hydroxylierende Gewebe. Schließlich würde eine intestinale Konjugation von Äthinylöstradiol die Bindung an Blutzellen und die Invasion ins Fett verhindern und damit die Plasmaspiegel erhöhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Resorption von Äthinylöstradiol im Darm der Ratte und die Metabolisierungsgeschwindigkeit zu untersuchen. Vorversuche haben gezeigt, daß das Substrat Äthinylöstradiol ungewöhnliches kinetisches Verhalten aufweist, und daß sein metabolischer Umsatz zum Teil sehr langsam und daher schlecht meßbar war. Daher wurde bei den meisten Versuchen -Naphthol als Vergleichssubstanz mitgeführt. Naphthol wurde gewählt, weil erstens die Resorption und der Metabolismus von -Naphthol im Darm bereits bekannt sind und zweitens die Metabolite von Naphthol leicht meßbar sind.

Formel 1 zeigt die Struktur von Äthinylöstradiol und Naphthol:





Äthinylöstradiol

1 -Naphthol

Formel 1

1. 4. Problematik des experimentellen Modells

Die vorliegende Untersuchung wurde im Rahmen einer größeren Studie zum Vergleich des Membrantransportes und der Metabolisierung von Fremdsubstanzen zwischen Leber und Darm angefertigt. Im Rahmen dieses Vergleiches sollen nicht nur die Umsätze bei der bilären Elimination bzw. der intestinalen Resorption verglichen werden, sondern möglichst auch biochemische Vorgänge, die diesen Umsätzen zugrunde liegen, quantifiziert werden. Resorption und Metabolismus im Darm unter in vivo Bedingungen können sehr gut mit Hilfe der isolierten Darmschlinge (15) untersucht werden. Dabei wird am narkotisierten Tier ein Dünndarmabschnitt von 5 cm Länge freigelegt, in das Lumen die radioaktiv markierte Substanz instilliert und anschließend das venös abfließende Blut in Fraktionen gesammelt und auf die Anwesenheit von Radioaktivität und Metaboliten untersucht. Dieses experimentelle Modell dürfte weitgehend die in vivo Bedingungen der Resorption imitieren, ist aber nicht geeignet für biochemische Parameter, wie

pH, Substratkonzentration, Temperatur, Zugabe von Hemmern, entweder nicht praktikabel oder aber unmöglich sind. Solche Variationen können nur im in vitro System durchgeführt werden. Unter den bekannten in vitro Systemen wurden vier ausgesucht und bezüglich ihrer Brauchbarkeit für die vergleichende Studie untersucht. Diese Modelle waren der isolierte Darmsack, ein Präparat, das bei der Erforschung der Kationentransporte, Aminosäurentranspote und Zuckertransporte im Darm eine große Rolle spielte, das Darmstück, das dem Darmsack ähnlich ist, aber ein offenes Lumen hat, Darmhomogenat, zur Untersuchung mikrosomaler Hydroxylierungs- und Glukuronidierungsreaktionen und schließlich isolierte Darmzellen.

1. 5. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele. Erstens soll Resorption und Metabolismus von Äthinylöstradiol im Darm der Ratte möglichst umfassend untersucht werden. Damit soll ein Beitrag geleistet werden zum besseren Verständnis der Rolle des Darmes bei der Pharmakokinetik von Äthinylöstradiol, einem der wichtigsten Pharmaka unserer Zeit. Zweitens soll, unter Verwendung von Äthinylöstradiol und Naphthol, als Substraten, die Eignung verschiedener experimenteller Modelle für Untersuchungen der intestinalen Resorption und Metabolisierung ausgewetet werden. Das bestgeeignete Modell soll in künftigen vergleichenden Untersuchungen zwischen Leber und Dünndarm herangezogen werden.

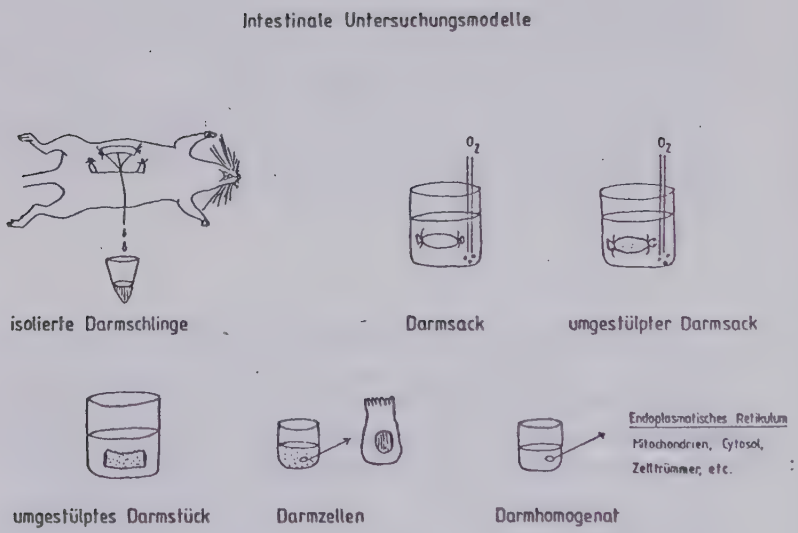


Abb. 1: INTESTINALE UNTERSUCHUNGSMODELLE
Beschreibung siehe Text

2. MATERIAL UND METHODEN

2. 1. MATERIAL

2. 1. 1. Radioaktive Substanzen

17α-[6,7^{3}H]Äthinylöstradiol (0,25 mCi/1,3ug) und ^{14}C-Methylglucose (360 mCi/mmol) wurden von NEN (Boston) bezogen. 2.4.6.7^{3}H-Äthinylöstradiol wurde durch Synthese aus 2.4.6.7 ^{3}H-Östron gewonnen. Es war ein Geschenk von Prof.Bolt (Tübingen). 1-[1-^{14}C]Naphthol (20,1 mCi/mmol) und $^{3}H_2O$ (5mCi/ml) wurden bei AMERSHAM BUCHLER (Braunschweig) gekauft.

2. 1. 2. Chemikalien

Äthinylöstradiol (17α Äthinylöstratien[1,3,5(10)]-diol-(3,17ß) war von MERCK. Ebenso 1 -Naphthol pro analysi; DC-Plastikfolien, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,2mm; Urethan für die Narkose und alle anderen nicht extra aufgeführten Chemikalien. ß-Glukuronidase aus Rinderleber 20 U/g (research grade), ß-Glukuronidase/Arylsulfatase Aktivität 2,5 U/ml, und Heparin-Natrium 168000 I.E./g wurde bei SERVA gekauft. Bei BOEHRINGER UDPGA (Uridin-diphosphat-glukuronsäure) und NADPH (ß Nicotin-amid-adenin-dinukleotid Phosphat, reduziert) Dithiothreit, Methylglucose (3-O-Methyl-[-D-Glucopyranoside]) Trypsin-Inhibitor und Saccharolacton wurden von SIGMA (München) bezogen. Die Silikonöle AR 20 und AR 200 für die Zellfiltration waren von Wacker Chemie (München) und Leibovitz-L 15-Medium von SEROMED (München).
Bray-Szintillator: Zur Herstellung von 2 ltr. werden gemischt: 7,96g PPO (2,5 Diphenyloxazol) (Koch-Light-Laboratories England) und 0,80g POPOP (1,4-D;[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene (Koch-Light-Laboratories England) und 120g Naphthalin (Merck) und 200 ml Methanol (Merck) und 40 ml Äthylenglycol (Merck) und 1760 ml Dioxan (Merck).

2. 1. 3. Tiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten aus der Tierzuchtanstalt Ivanovas in Kisslegg/Allgäu wurden zu Versuchszwecken verwendet. Die Ernährung der Tiere setzte sich zusammen aus Altromin Trockenfutter und Wasser ad libitum. Das Gewicht der Ratten betrug bei den in vivo Versuchen 350g-420g und bei den in vitro Versuchen 200g-250g.

2. 2. METHODEN

2. 2. 1. Versuchsdurchführung

2. 2. 1. 1. Ganztier, isolierte Darmschlinge

Die Narkotisierung der Ratte erfolgte durch einmalige Gabe von 1,4 ml Urethan (1g/4ml 0,9% NaCl) in die Bauchhöhle nach vorheriger Betäubung in Äther. Danach wurde der Bauchraum eröffnet und ein Dünndarmabschnitt von 3,5cm-5,5cm Länge ausgesucht, dessen abführende Vene unverzweigt und ausreichend dick für die Punktion war (Darmschlinge). Damit das zu sammelnde Blut nicht gerinnt, wurden 0,13 ml Heparin-Natrium (10mg/500ul 0,9% NaCl) in die vena femoralis injiziert.

Um kollaterale Gefäße entlang der Darmwand zu unterbinden, wurden die beiden benachbarten Darmabschnitte abgeschnürt. Die Darmschlinge wurde nur durch eine Arterie versorgt und das gesamte Blut floß durch die parallel verlaufende Vene ab. Beide Enden der Darmschlinge wurden durch eine Inzision eröffnet und das Lumen wurde mit angewärmter 0,9% NaCl-Lösung ausgespült. Dann wurde die Darmschlinge an einer Seite abgebunden und auf eine angewärmte Unterlage gelegt. Nach erfolgreicher Punktion der Vene wurde in die noch offene Inzisionsstelle eine Tuberkulinspritze eingebunden, die 0,5ml der radioaktiven Substanz in 0,9% NaCl-Lösung, 5mM Phosphatpuffer, pH 7,2 , enthielt. Diese Lösung

wurde in das Lumen eingespritzt; dann wurde fest zugebunden. Nach dem Starten der Uhr wurde das venöse Blut zuerst 21 min lang in 3 min Intervallen in gewogenen Eppendorfgefäßen gesammelt, später 50 min lang in 10 min Intervallen. Am Versuchsende wurde der noch verbliebene Inhalt gesammelt und sein Volumen bestimmt. Die Mucosa wurde vorsichtig abgeschabt und homogenisiert. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung kühl und dunkel gelagert. Durch Wägung der gefüllten Gefäße wurde das Blutvolumen bestimmt und daraus der Blutfluß berechnet. Dann wurde das Blut zentrifugiert und die Radioaktivität in Serum, Erythrozyten, sowie in Aliquots von Inhalt und homogenisierter Mucosa ermittelt.

Mittels des Hämatokrites wurde aus den Aktivitäten in Serum und Erythrozyten die Gesamtaktivität im Blut berechnet. Bei einem Tier wurde der Blutverlust durch Infusion von frisch gesammeltem heparinisierten Rattenblutes in die V. femoralis kompensiert. Die durch die Pumpe bestimmte Infusionsgeschwindigkeit entsprach der Menge des verlorenen Blutes pro Zeiteinheit.

Bei zwei Tieren wurde während des Versuches Galle über eine Polyäthylenkanüle gesammelt, die vorher in den Gallengang gelegt wurde. Es sollte festgestellt werden, ob Äthinylöstradiol über mögliche Kollateralen der abgebundenen Darmschlinge über den Blutweg in die Galle gelangt.

Bei zwei weiteren Tieren wurde das von dem intestinalen Bereich abführende Lymphgefäß, durch Verabreichungvon 2 ml Olivenöl in den Magen sichtbar gemacht, mit einer Polyäthylenkanüle, die unter dem Leberlappen und der unteren Hohlvene durchgeführt wurde, punktiert (16).

Um festzustellen, ob die Verweildauer von Äthinylöstradiol im Lumen der Darmschlinge einen Einfluß auf die Resorption oder auf den Metabolismus hat, wurde in zwei weiteren Versuchen das Darmlumen mit der radioaktiven Substanz perfundiert. Dazu wurde der Darm an zwei Seiten angeschlitzt. An der einen Seite wurde das vordere Ende einer Injektionsspritze eingebunden (5 ml Glasspritze), die das Perfusionsmedium (0,9% NaCl; 5mM Phosphatpuffer, pH 7,2; ^{3}H-Äthinyl-

östradiol) enthielt. Der Stempel der Spritze wurde mit konstanter Geschwindigkeit vorwärts bewegt. Am anderen Ende war ein Polyäthylenschlauch eingebunden, an dessen Ende das abfließende Perfusat in 10 min Abständen gesammelt wurde.

Bei allen diesen Ganztierversuchen ermittelte man wasserlösliche Metabolite des Äthinylöstradiols in den verschiedenen Kompartimenten. Dazu extrahierte man je 100ul Serum, Erythrozyten, Lumen, Inhalt und Mucosahomogenat mit 100ul Chloroform und bestimmte in wässriger und organischer Phase die Radioaktivität.

2. 2. 1. 2. Darmsäcke

a) nicht umgestülpt

Der narkotisierten Ratte wurde wie unter 2. 1. 1. beschrieben der Bauch eröffnet. Mit einer Schere wurde das Duodenum distal von der Einmündung des Gallenganges durchtrennt. Dann wurde der Darm unter vorsichtigem Zug bei gleichzeitigem stumpfen Durchtrennen der Gefäße und Bindegewebe herausgelöst. Nach Ausspülen des isolierten Darmes mit eiskalter 0,9% NaCl-Lösung wurden 6 Darmstücke (je 3cm lang), beginnend 30 cm nach dem Magen, geschnitten und am oberen Ende mit einem Faden zugebunden. In die untere Öffnung wurde das Ende einer Tuberkulinspritze, die 200ul Medium mit ^{3}H-Äthinylöstradiol bzw. ^{14}C-Naphthol enthielt, eingebunden. Nach Einspritzen des radioaktiven Mediums in das Lumen des Darmsackes wurde unter Beibehaltung des Fadenzuges die Spitze vorsichtig herausgezogen. Die Darmsäcke wurden von außen kurz mit 0,9% NaCl-Lösung abgespült, dann sofort in 3 ml Leibovitz L 15-Medium (Medium für die Zellkultur, enthält Substrate, Salze und Vitamine) überführt und unter Schütteln und O_2-Begasung bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 20, 40, 60, 80 min wurde je eine Inkubation beendet; 300ul Medium wurden abgenommen, der Lumeninhalt vorsichtig durch

einen Einschnitt in den Darmsack herausgelassen und gesammelt. Zum Schluß wurde die Darmwand des Sackes bis auf die Serosa abgeschabt und in 400ul Wasser homogenisiert. Die Radioaktivität in Medium, Inhalt und Mucosa wurde bestimmt. 100ul aus allen drei Kompartimenten wurden mit 100ul Chloroform versetzt. Der Anteil an Konjugaten in der wässrigen Phase wurde sowohl durch Szintillationszählung als auch dünnschichtchromatographisch und durch enzymatische Hydrolyse bestimmt.

b) umgestülpt

Ein 18cm langes Darmstück wurde, wieder beginnend 30cm nach dem Magenausgang, aus dem Dünndarm herausgeschnitten. Zum Umstülpen des gesamten Abschnittes wurde zunächst ein 25cm langer, 2mm dicker Plastikstab vorsichtig durch das Lumen geschoben. Mit einem Faden, der an einer Öse am Ende des Stabes befestigt war, wurde der Rand des Darmstückes umschlungen. Durch Zurückziehen des Stabes wurde der Darmabschnitt umgestülpt. Dehnt man den Darm bei dieser Manipulation lateral, so wird der daraus gebildete Darmsack undicht. Das umgestülpte Darmstück wurde in 6 Teile à 3cm Länge geteilt, aus denen wie bei a) Säcke gebildet wurden. Die Tuberkulinspritze enthielt allerdings keine radioaktive Substanz, sondern reines Leibovitz L-15 Medium. Die Darmsäcke wurden in 3ml 0,9% NaCl-Lösung inkubiert, unter O_2-Begasung und Schütteln, die zusätzlich 10ul ^{3}H-Äthinylöstradiol bzw. ^{14}C-Naphthol enthielt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei a).

2. 2. 1. 3. Darmstücke

Der Dünndarm wurde wie unter 2. 2. 1. 2. a) beschrieben aus der Ratte entnommen und wie in 2. 2. 1. 2. b) beschrieben

umgestülpt und in 1cm Stücke geschnitten. Die Darmstücke wurden einzeln in 3ml Leibovitz L-15 Medium unter Zugabe von ^{3}H-Äthinylöstradiol bzw. ^{14}C-Naphthol bei 37°C unter O_2-Begasung und Schütteln inkubiert. Wasserlösliche Metabolite wurden durch Extraktion in Chloroform bestimmt.

2. 2. 1. 4. Darmhomogenat

Operation siehe 2. 2. 1. 2. a). Der Darm wurde mit 0,9% NaCl-Lösung ausgespült und längs aufgeschnitten. Auf einer eisgekühlten Unterlage wurde die Mucosa (oberes Drittel der Darmwand) durch Abschaben mit einer Rasierklinge gewonnen, anschließend gewogen. Mit 100mM Tris·HCl Medium, pH 7,2 und 10mM $MgCl_2$, wurde auf ein fünffaches Volumen aufgefüllt, dann gepottert (10 mal, insgesamt 1 min lang, 5U/sec, 0°C). Das Homogenat wurde in Eis aufbewahrt. Die Inkubationen erfolgten in 500ul Tris·HCl Medium bei 37°C unter Rühren und Zugabe von Substrat, sowie Cofaktoren (UDPGA, NADPH):

Inkubationsansatz:

Tris·HCl-Puffer (1M, pH 7,4)	0,05ml
$MgCl_2$ (0,05M)	0,05ml
Homogenat	x ml
H_2O	(350 - x)ml
Aktivität	0,005ml
UDPGA (30mM)	0,05ml
	∑ 0,5 ml

Abnahme zu verschiedenen Zeiten von je 100ul Inkubat in 100ul Chloroform. Aliquots der wässrigen und der organischen Phasen wurden abgenommen und darin die Radioaktivität bestimmt.

Sowohl Äthinylöstradiol als auch Naphthol können im Darmhomogenat glukuronidiert werden. Diese Reaktion läuft an den Mikrosomen ab und ist auf die gleichzeitige Gabe von UDPGA angewiesen. In Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Ausbeute an gebildeten Glukuroniden nicht nur von dem Reaktionsmedium, sondern auch von den Extraktionsmitteln abhängt.

Abb.2 zeigt die Ausbeute an wasserlöslichen Glukuroniden von Äthinylöstradiol und Naphthol nach Inkubation in zwei verschiedenen Medien und Extraktion unter drei verschiedenen Bedingungen. Es wurde nur einmal extrahiert. In allen Fällen entsteht in Tris.HCl und Magnesiumpuffer wesentlich mehr wasserlösliches Produkt als im Suspensionsmedium, das zusätzlich 2,5% Serumalbumin enthält. Die niedrige Ausbeute im Suspensionsmedium dürfte nicht nur an einer geringeren Umsatzrate in diesem Medium liegen, sondern auch an einer geringeren Extraktion von Glukuroniden aus diesem Medium, da denaturiertes Albumin in der Lage ist, die Glukuronide festzuhalten.

Das Fällen biologischer Makromoleküle mit Glycin-TCA, pH 4,0 , ergab insbesondere für Äthinylöstradiol eine wesentlich schlechtere Ausbeute wasserlöslicher Produkte, als wenn direkt mit Butyl-methyläther extrahiert wurde. Anscheinend begünstigt der geringe Ionisationsgrad des Glukuronides bei pH 4 den Übergang in die organische Phase. Die Extraktion mit Chloroform und Tertiär-butyl-methyl-äther, zwei Lösungsmitteln mit ähnlichen polaren Eigenschaften, war annähernd identisch. Da aber die wässrige Phase nach Ausschütteln mit Chloroform besser entnommen werden kann, als nach Ausschütteln mit Butyl-methyläther wurden die weiteren Versuche in Tris·HCl Medium unter Extraktion mit Chloroform vorgenommen. Diese Methode wurde zusätzlich überprüft durch Dünnschichtchromatographie.

Abb. 2: GLUKURONIDIERUNG VON ÄTHINYLÖSTRADIOL UND NAPHTHOL IM DARMHOMOGENAT. EINFLUß DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

Homogenat von Rattenjejunum (Ratte 140g schwer), wurde durch Abschabung des oberen Drittels der Darmmucosa und anschließendes Pottern des Materials gewonnen. Je 100µl Homogenat (2mg Protein) wurden mit 0,5ml Inkubationsmedium versetzt und bei 37°C unter Rühren inkubiert. Folgende Inkubationsmedien wurden verwendet: Tris·HCl (□), pH 7,4; Suspensionsmedium (△), pH 7,2. Als Substrat wurde ^{3}H-Äthinylöstradiol (1µM), bzw. ^{14}C-Naphthol (50µM) und als Cosubstrat gleichzeitig UDPGA (3mM Endkonzentration) zugegeben. In den angegebenen Zeiten wurden je 100µl entnommen und unter verschiedenen Bedingungen mit gleichen Volumina eines organischen Lösungsmittels extrahiert. Die Diagramme zeigen die H_2O-löslichen Anteile in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei verschiedenen Extraktionsbedingungen: Die Schnittpunkte der Kurven mit den y-Achsen ergeben die prozentualen Anteile an reinem Äthinylöstradiol und Naphthol, die bei der Extraktion in die Wasserphase übergehen.

Glukuronidierung von Äthinylöstradiol und Naphthol im Darmhomogenat. Einfluß der Extraktionsbedingungen.

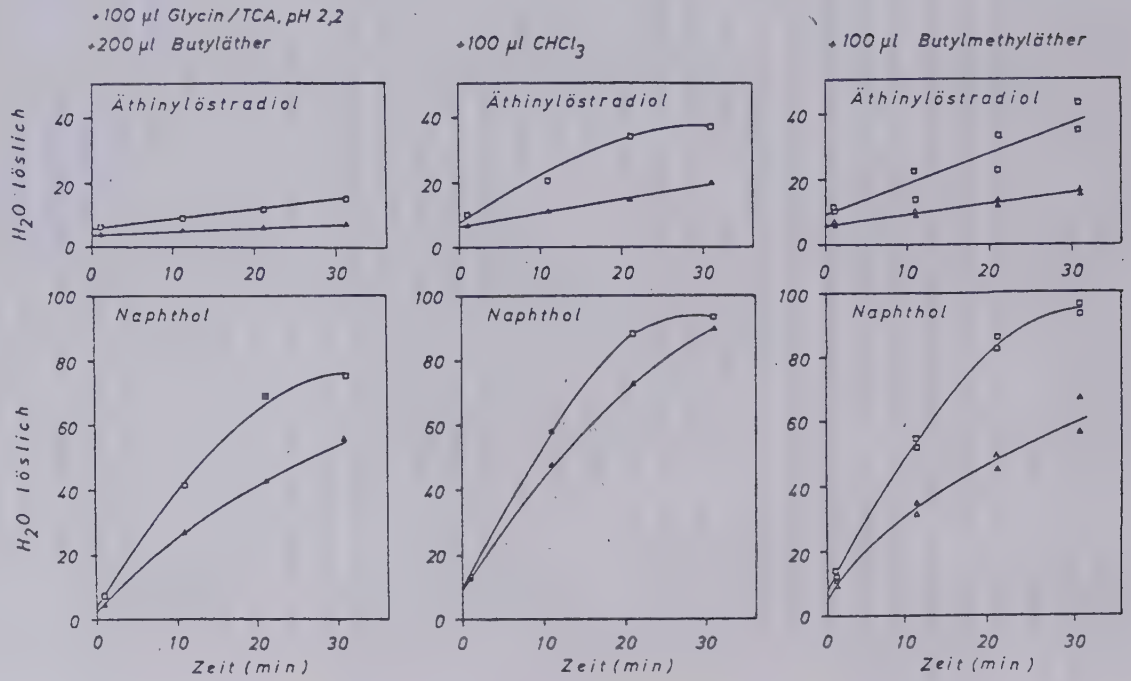


Abb. 2

2. 2. 1. 5. Darmzellen

Mucosazellen aus dem Dünndarm von Ratten wurden nach der Methode von "Weiser" (17) präpariert. Bei diesem nicht enzymatischen Verfahren wurden 60cm des Dünndarmes (entnommen wie unter 2. 2. 1. 2.) mit 12ml eines Mediums gefüllt, das reich an Citrat (27mM) ist und außerdem 96mM NaCl, 1,5mM KCl und 5,6mM Na_2KPO_4 (pH 7,3) enthält. Der Darm wird in ein Becherglas, das 50ml desgleichen Mediums enthält überführt und an einem Ende mit einem Rührmagneten festgebunden. Nun wird 15 min unter Begasung mit 100% Sauerstoff bei 37°C gerührt. Der Darm wird entnommen, am Ende angeschnitten, entleert und nun mit einem neuen Medium gefüllt, das als wichtigste Komponenten 0,5mM Dithiothreitol (frisch aufgelöst) und 1,5mM EDTA enthält, gelöst in einem Puffer aus 16mM Na_2HPO_4 und 140mM NaCl. Der Darm wird wieder in 50ml desselben Mediums aufgenommen und unter Sauerstoffbegsung bei 37°C 10 min lang gerührt. Dann wird der Darminhalt entleert und verworfen, die Behandlung mit dem Dithiothreitol-Medium wiederholt. Nach 10 min wurde der Inhalt, der reich an kleineren einschichtigen Mucosaepithelplatten und Einzelzellen war, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde 2 mal wiederholt. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden 5 min lang bei 500 x g zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment und die Suspension zum Abtrennen der Einzelzellen von Zellverbänden durch ein Nylontuch mit der Maschenweite 100u x 100u filtriert. Als Inkubationsmedium wurde MEM = Minimum Essential Medium Eagle (ohne $NaHCO_3$ und Phenolrot) verwendet. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 3ml eiskalten Mediums aufgenommen und im Eisbad zur sofortigen Verwendung kühl gestellt. Die Darmzellen wurden in 500ul Inkubationsmedium bei 37°C unter Rühren zunächst 5 min lang vorinkubiert. Dann wurden 5ul der ^{14}C-Naphthol- bzw. ^{3}H-Äthinylöstradiol-Lösung zugegeben. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeiten je 100ul aus den Inkubaten entnommen und in 100ul Chloroform überführt. Nach Schütteln und Zentrifugieren wurden aus beiden Phasen

je 10ul für die Szintillationszählung entnommen. Zur Messung der Aufnahmegeschwindigkeit von ^{3}H-Äthinylöstradiol in die Zellen, wurden die Zellen nach der Inkubation mittels Zentrifugation durch die Silikonschicht vom Medium abgetrennt und ihre Radioaktivität bestimmt.

Vitalität der Zellen:

Die Zellen wurden mikroskopisch beurteilt. Sie lagen zum größten Teil als Einzelzellen vor und bildeten Aggregate von maximal 10 Zellen (größere Aggregate wurden nicht filtriert). Die Einzelzellen hatten ihre längliche Form behalten und trugen größtenteils einen Bürstensaum. Trypanblau wurde von etwa 12% der Zellen aufgenommen.

2. 2. 2. Analysen

2. 2. 2. 1. Behandlung der Proben

Äthinylöstradiol und Naphthol sind sowohl lichtempfindliche als auch temperaturempfindliche Substanzen. Werden sie dem Licht oder höheren Temperaturen ausgesetzt, so zerfällt ein Teil in wasserlösliche Zerfallsprodukte. Deswegen wurden alle Proben sofort nach der Gewinnung im Kühlschrank dunkel gestellt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte im Eisbad.

2. 2. 2. 2. Extraktion

Zum Denaturieren des Materials und zum Nachweis neu gebildeter wasserlöslicher Metabolite wurden Aliquots des Tiermaterials bei den Ganztierversuchen bzw. des Inkubationsmediums bei den in vitro Versuchen in Eppendorfröhrchen mit gleichen Volumina Chloroform versetzt und gut geschüttelt. Zur Trennung der beiden Phasen wurde eine Minute zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge). Dabei bildet sich zwischen den beiden Phasen eine geschlossene Schicht von denaturiertem Protein. Zur Bestimmung des Anteils wasser-

löslicher Metabolite an der Gesamtradioaktivität wurden in der Regel 20ul aus der wässrigen Phase und 20ul aus der Chloroformphase für die Szintillationszählung entnommen. In einer Versuchsserie wurde ermittelt, daß unabhängig von der Äthinylöstradiolkonzentration immer 5% des ^{3}H-Äthinylöstradiols in die Wasserphase übergehen.

2. 2. 2. 3. Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung der wasserlöslichen Metabolite wurden Anteile aus den wässrigen Phasen dünnschichtchromatographiert (Silicagel 60; Fließmittel: Butanol, Propionsäure, 0,01M Tris (50: 0,7: 10)). Dieses Fließmittel wurde ursprünglich zur Trennung von Gallensäurekonjugaten entwickelt (18). Je 20ul der wässrigen Phasen wurden auf eine 7cm lange Folie in 2,5cm breiten Banden aufgetragen. Die Folien wurden aufsteigend entwickelt, bis das Fließmittel das obere Ende erreichte. Dann wurde jede Bande mit einer Schere in 7 Fraktionen à 1cm geschnitten und diese Fraktionen in Szintillationsröhrchen gegeben.

Als Vergleichssubstanzen wurden Äthinylöstradiol bzw. Naphthol bzw. deren Glukuronide mitchromatographiert. Die unkonjugierten Verbindungen liefen nahe der Front und erschienen in der siebten Fraktion.

2. 2. 2. 4. Enzymbehandlung

Zur Identifizierung der Konjugate wurden Anteile der wässrigen Phase dünnschichtchromatographiert, teilweise nach Behandlung mit Sulfatase oder Glukuronidase. Dazu wurden 20ul-40ul wässrige Phase 15 Std. lang bei 37°C enzymatisch behandelt mit Glukuronidase bzw. Sulfatase. In zwei Kontrollansätzen, einem ohne Enzym bei 37°C und einem bei 0°C wurde getestet, ob Äthinylöstradiol unter den Inkubationsbedingungen stabil ist. Die Enzymlösungen wurden hergestellt aus 20ul 0,1M Acetatpuffer, pH 4,8 und 4mg Glukuronidase bzw. 10ul 0,1M Acetatpuffer und 10ul Sulfataselösung:

Bezeichnung Temperatur	Glukuronidase 37°C	Sulfatase 37°C	Kontrolle 37°C	Kontrolle 0°C
Acetatpuffer (0,1M)	--	--	5ul	5ul
Enzym	5ul	5ul	--	--
Probe H_2O-Phase	40ul	40ul	40ul	40ul

2. 2. 2. 5. Säulenchromatographie

Zum Nachweis von lipophilen Metaboliten wurden Aliquots aus der Chloroformphase zur Trockenen eingedampft, in Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen und dann über eine Säule (3g Al_2O_3 mit 4% H_2O) nach der Methode von Ittrich (19) getrennt.

2. 2. 2. 6. Bestimmung von freigesetztem ^3H_2O

Bei der 2-Hydroxylierung von 2.4.6.7.^{3}H-Äthinylöstradiol wird ^3H_2O abgespalten und geht in die wässrige Umgebung über. ^3H_2O wurde mittels Vakuumdestillation bestimmt: Aliquots der wässrigen Phasen der Proben (nach Extraktion mit Chloroform) wurden auf 500ul aufgefüllt. Davon wurden 50ul zur Bestimmung der Radioaktivität direkt abgenommen. Der Rest wurde über eine 6cmlange Destille mit wasserge-

kühltem Mantel und Wasserstrahlpumpenvakuum unter Erwärmen der Vorlage auf 55°C destilliert. 200ul des destillierten Wassers wurden für die Szintillationszählung abgenommen.

2. 2. 2. 7. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Methode von Biuret (20) bestimmt.

2. 2. 2. 8. Szintillationszählung

Die radioaktiven Proben wurden in kleinen Szintillationsgefäßen (mini vials) mit 3,5ml Braylösung versetzt und in den Packard Szintillationszähler gestellt.

2. 2. 3. Präsentation der Daten

Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, daß Resorption und Metabolismus der lipophilen Verbindungen, Äthinylöstradiol und Naphthol, im weitem Konzentrationsbereich von 10uM bis 4mM nicht in Gesetzen der Enzymkinetik folgen. Die Angabe absoluter Umsatzgeschwindigkeiten (nmol/mg Protein) erschwert einen Vergleich zwischen diesen Versuchen. Deswegen wurden im allgemeinen Umsätze nicht in absoluten Mengen, sondern als Prozentzahlen angegeben, abweichend von der üblichen Darstellungsweise in der Biochemie.

Säulenchromatographie von Äthinylöstradiol. Elutionsprofil.

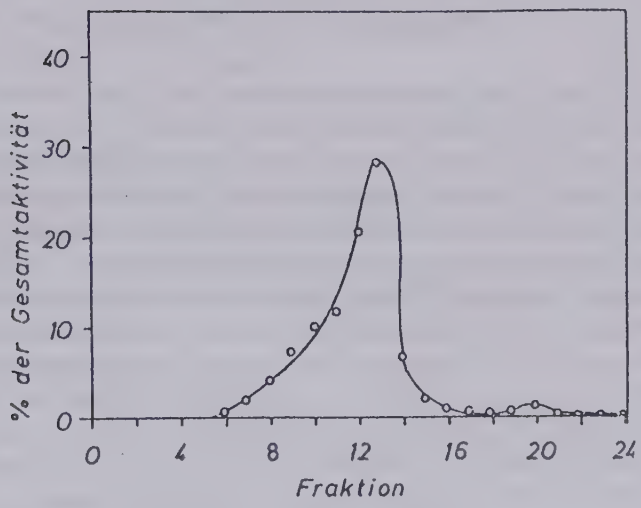


Abb. 3: SÄULENCHROMATOGRAPHIE VON ÄTHINYLÖSTRADIOL ELUTIONSPROFIL

3. ERGEBNISSE

3. 1. Ganztier

3. 1. 1. Resorption in der isolierten Darmschlinge

Resorption und Metabolismus von ^{3}H-Äthinylöstradiol wurden zunächst am Ganztier untersucht, um Informationen unter in vivo Bedingungen zu erhalten. Abb. 4 zeigt eine typische Resorptionskurve.

3. 1. 1. 1. Abhängigkeit von der Durchblutung

Abb. 5 zeigt vergleichend die Resorption von Äthinylöstradiol in zwei Darmschlingen (zwei Ratten), von denen die eine eine Durchblutung von etwa 50ul/min aufwies, die andere einen Blutfluß von etwa 400ul (oberes Diagramm). Im unteren Diagramm ist das Erscheinen von Radioaktivität im Blut bei beiden Tieren kumulativ aufgetragen. Beim Tier mit dem niedrigen Blutfluß werden nach 30 min 50% des ^{3}H-Äthinylöstradiols im Blut resorbiert, beim Tier mit dem höheren Blutfluß dagegen 76%. Obwohl der Blutfluß 700% höher ist, unterscheidet sich die Resorptionsrate nur um 53%. Damit hat sich gezeigt, daß der Blutfluß - solange er ein Minimum nicht unterschreitet - nur einen geringen Einfluß auf die Resorptionsgeschwindigkeit ausübt.

3. 1. 1. 2. Erscheinen der Radioaktivität in Lymphe und Galle

Es wäre denkbar, daß Äthinylöstradiol, analog zu dem chemisch ähnlich gebauten Steroid Cholesterin, teilweise über den Lymphweg abtransportiert wird. Deshalb wurde bei 3 Tieren während der Resorption von ^{3}H-Äthinylöstradiol nicht nur das venöse Blut, sondern gleichzeitig auch die gesamte Lymphe aus dem Dünndarmbereich gesammelt.

In den ersten 40 min flossen 2,7ul Lymphe/min; die Lymphe enthielt 0,2% der Gesamtaktivität; in den folgenden

30 min (2,8ul/min) 0,02% der Gesamtaktivität.

Weiter wäre denkbar, daß Äthinylöstradiol durch sehr kleine Venen, die gelegentlich parallel zur kanülisierten Vene verlaufen, direkt in den Blutkreislauf gelangt. In diesem Falle würde das Äthinylöstradiol von der Leber aufgenommen und konzentriert in die Galle abgegeben werden. Bei zwei Tieren wurde der Gallengang vor der Präparation der isolierten Darmschlinge punktiert. Die Galle wurde, während der Resorptionsmessung, in Fraktionen gesammelt. Bei drei Tieren wurden im Mittel 0,8% der Gesamtaktivität in der Galle innerhalb 71 min wiedergefunden.

3. 1. 1. 3. Konzentrationsabhängigkeit

Abb. 6 zeigt die Resorption von ^{3}H-Äthinylöstradiol, dessen Konzentration im Darmlumen bei einer Ratte sehr niedrig (40nM), bei einer anderen Ratte sehr hoch (2mM) war. Obwohl bei der hohen Konzentration die Löslichkeit von ^{3}H-Äthinylöstradiol in der 0,9% NaCl-Lösung längst überschritten war, war ihre Resorptionsgeschwindigkeit nicht wesentlich geringer.

3. 1. 1. 4. Resorption von Wasser und Methylglukose

Es war interessant die Resorptionsgeschwindigkeit von Äthinylöstradiol mit der Resorption einer wasserlöslichen Substanz, bei der eine Carrierbeteiligung vorliegt, zu vergleichen.

Abb. 7 zeigt die Resorption von Methylglukose, einer Verbindung, die über den Glukosecarrier transportiert wird, aber nicht metabolisiert werden kann. Die Anfangsgeschwindigkeit der Resorption dieses Zuckers verläuft etwa drei mal langsamer, als die von ^{3}H-Äthinylöstradiol. Man kann diese langsamere Resorption von Methylglukose dadurch erklären, daß diesem Zucker nur eine begrenzte Anzahl von Carriermolekülen für die Aufnahme zur Verfügung steht.

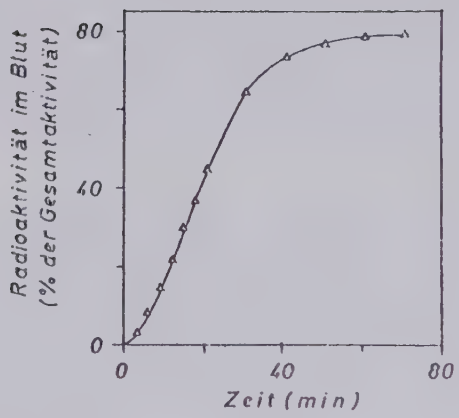


Abb. 4: RESORPTION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE

In eine isolierte Darmschlinge (Länge 2,3cm, Magenentfernung 50cm) einer 360g schweren Ratte wurden 0,5ml einer 10uM Lösung von Äthinylöstradiol in 0,9% NaCl eingefüllt. Das venöse Blut wurde quantitativ gesammelt, und die Radioaktivität im Blut über 71 min bestimmt. Gesamtaktivität ist die im Lumen verabreichte Aktivität.

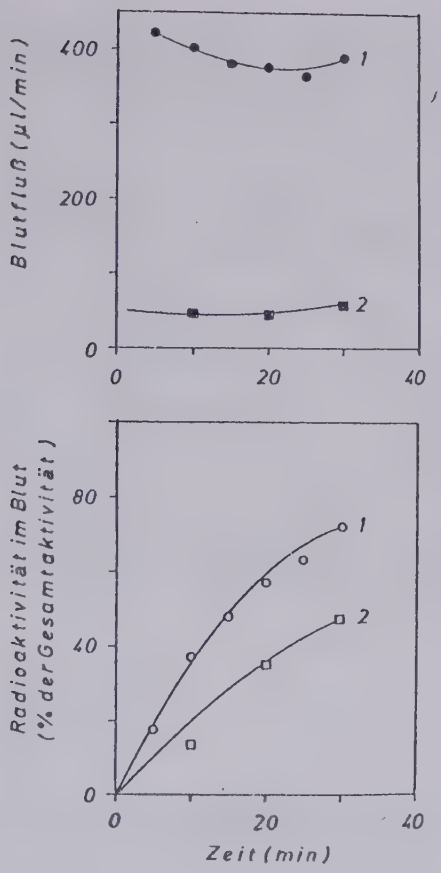


Abb. 5: EINFLUß DER DURCHBLUTUNG AUF DIE RESORPTION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL

Die Resorption von Äthinylöstradiol (je 100nM in 0,5ml 0,9% NaCl) wurde in 2 Darmschlingen (5cm lang) mit sehr unterschiedlicher Durchblutung gemessen. Bei dem Tier 1 (●) wurde während des Versuches Rattenblut infundiert und damit eine sehr hohe Durchblutungsrate aufrechterhalten. Bei dem Tier 2 stellte sich ein sehr niedriger Blutfluß ein (■). Die untere Abbildung stellt die resorbierte Aktivität im Blut bei niedriger (□) bzw. hoher Durchblutung (○) dar. Die Resorptionsgeschwindigkeiten unterscheiden sich kaum.

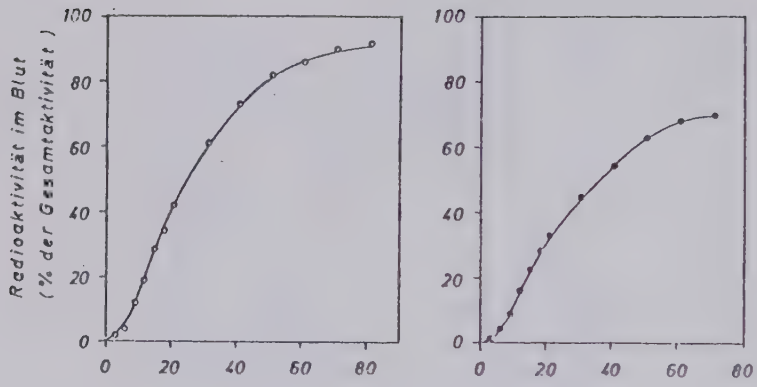


Abb. 6: RESORPTION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE: EINFLUß DER KONZENTRATION

Die Resorptionsstudie wurde an isolierten Darmschlingen von 2 Ratten (360g-370g schwer) durchgeführt. 0,5ml einer 0,9% NaCl-Lösung, die 40nM ^{3}H-Äthinylöstradiol (links), bzw. 2mM Äthinylöstradiol (rechts) enthielt, wurde ins Lumen gefüllt und die Resorption im Blut gemessen. Darmschlinge links: 60cm vom Magen, 4cm lang; Darmschlinge rechts: 32cm vom Magen, 3,5cm lang.
Die Abbildung zeigt das kumulative Erscheinen von Radioaktivität im Blut.

Abb. 7 zeigt weiterhin die Resorption von Tritiumwasser aus dem Darmlumen. Nach 50 min waren über 95% des Wassers resorbiert und mit dem Blut abtransportiert.

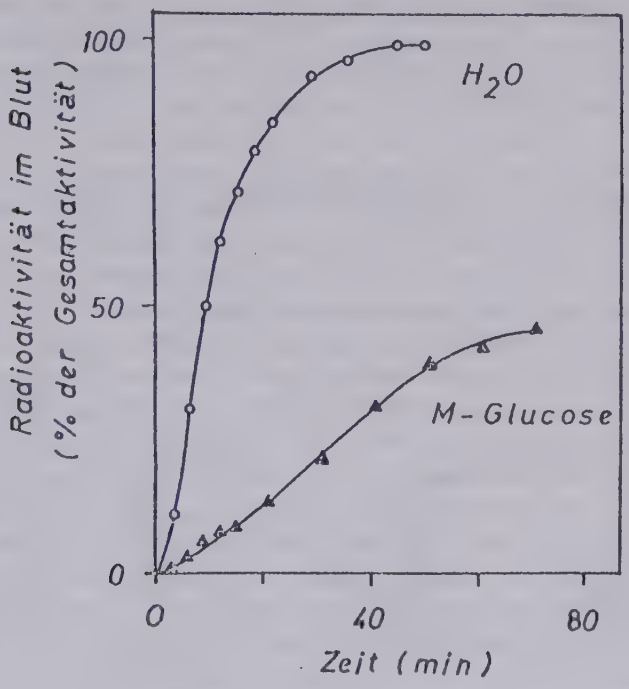


Abb. 7: RESORPTION VON WASSER UND METHYLGLUCOSE AN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE

Die Resorptionsstudien wurden an isolierten Darmschlingen von 2 Ratten (360g-380g schwer) durchgeführt. 0,5ml einer 0,9% NaCl-Lösung, die ^3H_2O enthielt (Darmschlinge 5,5cm lang, 26cm vom Magen entfernt) bzw. 0,5ml einer 0,9% NaCl-Lösung mit 100nM ^{14}C-Methylglucose (Darmschlinge 5,3cm lang, 37cm vom Magen entfernt) wurde in das Darmlumen gefüllt, und das Erscheinen von Radioaktivität im venösen Blut gemessen.

3. 1. 2. Metabolismus in der isolierten Darmschlinge

3. 1. 2. 1. Metabolismus am Steroidgerüst

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine 2-Hydroxylierung, der wichtigste metabolische Schritt von Äthinylöstradiol in der Leber, auch bei der Passage durch den Darm stattfindet. Eine einfache Methode die 2-Hydroxylierung zu messen, besteht in der Anwendung von 2.4.6.7. ^{3}H-Äthinylöstradiol, das bei der Hydroxylierung an der 2-Stellung ein $^{3}H^{+}$-Ion verliert, welches sich schließlich mit OH^{-} zu Tritium-Wasser verbindet. Zur Messung der 2-Hydroxylierung von Äthinylöstradiol in der isolierten Darmschlinge wurde 2.4.6.7. ^{3}H-Äthinylöstradiol in einer Konzentration von 2mM in 500ul 0,9% NaCl-Lösung in das Darmlumen gegeben. Diese hohe Konzentration war erforderlich, weil die spezifische Aktivität des verwendeten 2.4.6.7 ^{3}H-Äthinylöstradiol sehr gering war. Nach 80 min waren 53% des Äthinylöstradiols ins Blut resorbiert. Daraufhin wurden Darminhalt, Mucosahomogenat und das Serum auf die Anwesenheit von Tritiumwasser geprüft. Im Darminhalt und im Mucosahomogenat war kein Tritiumwasser nachweisbar, ebenso in den Blutzellen. Dagegen ließen sich beim Serum 0,8% der wasserextrahierbaren Radioaktivität destillieren, waren also mit Tritiumwasser identisch. Da bei der 2-Hydroxylierung von 2.4.6.7. ^{3}H-Äthinylöstradiol nur eine von vier radioaktiv markierten Stellen das Äthinylöstradiolmolekül verläßt, entsprechen diese 0,8% Wasser einer Menge von 3,2% der wasserlöslichen Äthinylöstradiolmetabolite, die hysroxyliert wurden. Da weiterhin 62% der Radioaktivität im Serum wasserlöslich waren, kann man sagen, daß 2% des Äthinylöstradiols im Serum 2-hydroxyliert wurde.

Um weitere mögliche metabolische Änderungen am Steroidgerüst von Äthinylöstradiol aufzufinden, wurde Serum zur Abtrennung von Äthinylöstradiol und seinen lipidlöslichen Metaboliten mit Chloroform extrahiert. Aus der organischen Phase wurde sowohl durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (in Zusammenarbeit mit Prof. Bolt), als auch über

eine Aluminiumoxydsäule versucht, Metabolite abzutrennen. Bei beiden Methoden ergab sich nur ein einziger Substanzpeak, der dem Äthinylöstradiol entsprach.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei der Passage durch die Darmmucosazelle das Äthinylöstradiolmolekül am Steroidgerüst nur in geringem Maße (2%) verändert wird und zwar ausschließlich durch 2-Hydroxylierung.

Metabolisierung von Äthinylöstradiol in der isolierten Darmschlinge.

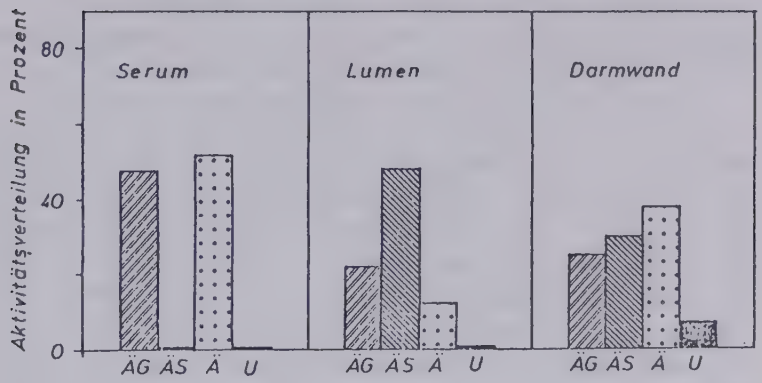


Abb. 8: METABOLISIERUNG VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE

Versuchsdurchführung siehe Abb. 4: Die Trennung der Metabolite aus dem Serum, Darminhalt und der Mucosa erfolgte nach 60 min dünnschichtchromatographisch. Die Metabolitenverteilung ist in % der Aktivität in den einzelnen Kompartimenten angegeben. Der Anteil der Gesamtaktivität in den 3 Kompartimenten war: Serum (80%), Inhalt (18%) und Mucosa (2%). Zur Darstellung der Metabolitenverteilung wurde die wiedergefundene Aktivität jedes Kompartimentes gleich 100% gesetzt.

3. 1. 2. 2. Intestinale Konjugation von Äthinylöstradiol

3. 1. 2. 2. 1. Metabolitenmuster in der isolierten Darmschlinge

Äthinylöstradiol wird in der isolierten Darmschlinge in beträchtlichem Ausmaße konjugiert. Sowohl im Serum, als auch im Mucosahomogenat und im Darminhalt werden Konjugate gefunden und bei insgesamt 16 Versuchen quantitativ bestimmt. Im Serum waren im Mittel 57 $\pm$10%konjugiert, in der Mucosa nach 80 min 48 $\pm$17% und im Lumen 72 $\pm$14% nach 80 min.

An einem Tier wurde das Metabolitenmuster dünnschichtchromatographisch genau analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Im Serum erscheinen etwa 50% des verabreichten Äthinylöstradiols (Ä) in unveränderter Form. 46% werden als Äthinylöstradiolglukuronid (ÄG) resorbiert, etwa 2% erscheint als Äthinylöstradiolsulfat (ÄS) und weitere 2% als unbekannter Metabolit (U). Dieses Metabolitenmuster ändert sich zwischen Beginn der Resorptionsmessung und Ende der Resorptionsmessung nach 80 min nicht. Darminhalt und Darmmucosa wurden nach 80 min auf Konjugate untersucht. 25% der Aktivität im Darminhalt stellten Äthinylöstradiolglukuronid dar und eine größere Fraktion von 51% wurde als Äthinylöstradiolsulfat identifiziert. Etwa 13% des Äthinylöstradiols waren nicht konjugiert und ein kleinerer Teil erschien wieder als unbekannter Metabolit. In der Darmwand schließlich lagen die Anteile an Äthinylöstradiolglukuronid, Äthinylöstradiolsulfat und Äthinylöstradiol bei 26%, 30,6% und 37%. Der unbekannte Metabolit machte 6% aus.

Es ist nun einerseits interessant, daß die Hälfte des im Serum erschienenen Äthinylöstradiol glukuronidiert ist und daß das Glukuronid im Serum der einzige wichtige Metabolit ist. Weiter interessant und unerwartet ist jedoch, daß auch im Darminhalt Konjugate gefunden werden, die wohl in den Mucosazellen synthetisiert und anschließend zur Lumenseite abgegeben wurden. Besonders interessant ist, daß im

Inhalt die Sulfate überwiegen, während im Serum die Glukuronide die größte Fraktion darstellen. Da bei diesem Versuch der Darminhalt erst nach 80 min analysiert wurde, kann über die Abgabegeschwindigkeit der Konjugate aus den Mucosazellen in den Darminhalt keine Aussage gemacht werden.

3. 1. 2. 2. 2. Metabolitenmuster in der perfundierten Darmschlinge

Deshalb wurde bei einer weiteren Darmschlinge das Darmlumen kontinuierlich mit einer Äthinylöstradiol-haltigen Lösung durchströmt. Sowohl das ausströmende Perfusat, als auch das venöse Blut wurden in Fraktionen à 10 min gesammelt und der zeitliche Verlauf des Erscheinens von Konjugaten in beiden Kompartimenten wurde untersucht.

Abb. 9 zeigt, daß im Perfusat innerhalb von 20 min die Konzentration an freiem Äthinylöstradiol bis auf 36% der infundierten Konzentration abnimmt. Im Gleichgewicht verlassen 22% der infundierten Aktivität das Perfusat in Form von Konjugaten. 42% der infundierten Aktivität wurde ins Blut resorbiert und erschienen dort vorwiegend (28%) in Form von Konjugaten. Es zeigt sich also, daß ein großer Anteil der in der Mucosazelle gebildeten Konjugate unter diesen steady-state Bedingungen in das Darmlumen zurückwandern kann. Die Abb.10 zeigt nun das Metabolitenmuster im Serum und im Perfusat nach 40 min. Das Metabolitenmuster ähnelt dem Muster in Abb. 8 . Im Serum überwiegen die Glukuronide, Äthinylöstradiolsulfat wurde nur in Spuren (1%) gefunden. Im Perfusat ist das Metabolitenmuster etwas anders als im Darminhalt der isolierten Darmschlinge: Der Anteil an unmetabolisiertem Äthinylöstradiol ist wesentlich größer, dagegen der Anteil an Sulfatkonjugat geringer, sogar geringer als der Anteil an Glukuroniden. Der Einfluß des Perfusionsflusses auf die Resorptionsgeschwindigkeit wurde nicht untersucht.

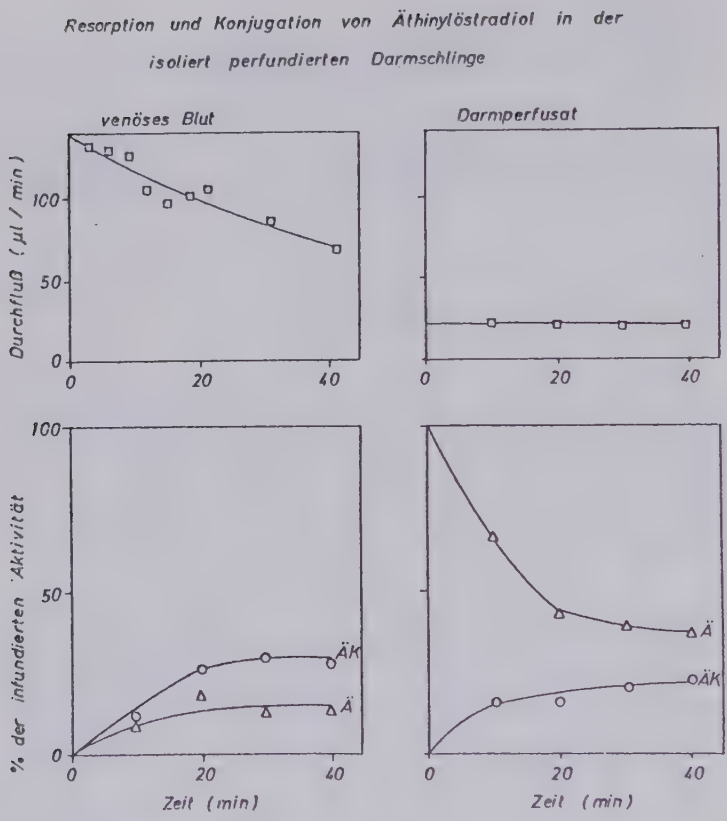


Abb. 9: RESORPTION UND KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN DARMSCHLINGE

Eine isolierte Darmschlinge (45cm lang, Entfernung vom Magen 44cm) einer 380g schweren Ratte wurde präpariert und mit 0,9% NaCl-Lösung, die 1uM Äthinylöstradiol enthielt, durchströmt. Das venöse Blut wurde quantitativ gesammelt. Die oberen Abbildungen stellen den Blutfluß und die Perfusionsgeschwindigkeit dar. Die unteren beiden Abbildungen gehören zusammen; 4 Punkte ergeben die infundierte Aktivität (100%).
Ä = unverändertes Äthinylöstradiol
ÄK= wasserlösliche Konjugate

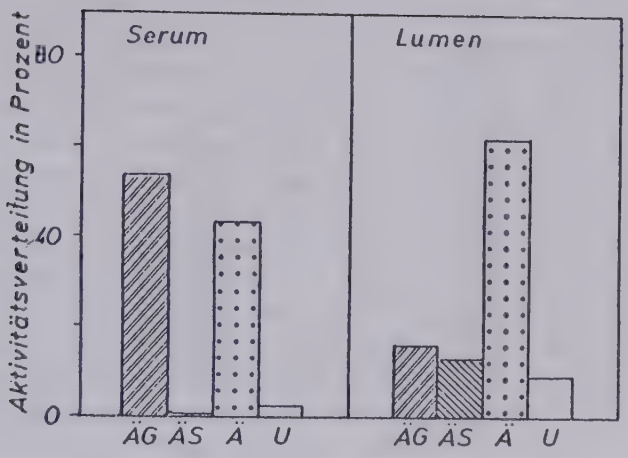


Abb. 10: RESORPTION UND METABOLISMUS VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN DARMSCHLINGE

Versuchsdurchführung siehe Abb. 9:
Die Trennung der Metabolite in den Kompartimenten erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Zur Darstellung der Metabolitenverteilung wurde die wiedergefundene Aktivität jedes Kompartimentes gleich 100% gesetzt.

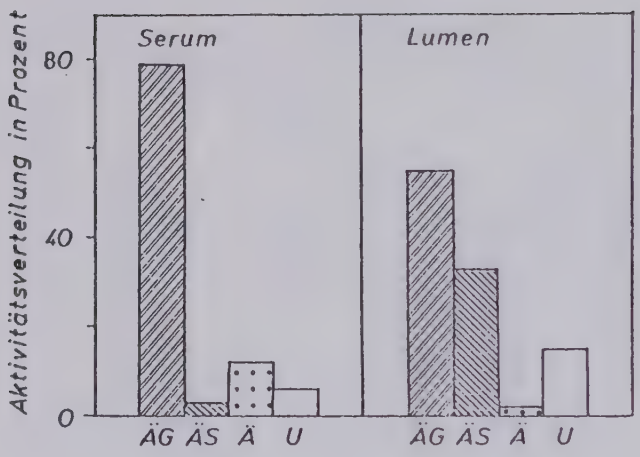


Abb. 11: RESORPTION UND METABOLISMUS VON ÄTHINYLÖSTRADIOL-GLUKURONID IN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE

Versuchsdurchführung siehe Abb. 12:
Die Trennung der Metabolite in den Kompartimenten erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Zur Darstellung der Metabolitenverteilung wurde die wiedergefundene Aktivität jedes Kompartimentes gleich 100% gesetzt.

3. 1. 2. 2. 3. Dekonjugation von Äthinylöstradiol-Glukuronid

Äthinylöstradiolglukuronid wird langsamer aus der isolierten Darmschlinge ins Blut resorbiert als Äthinylöstradiol, wie die Abb. 12 zeigt. Es war nun interessant zu wissen, ob der resorbierte Anteil vor oder während seiner Aufnahme durch Glukuronidasen im Darm zu freiem Äthinylöstradiol gespalten wurde. Abb. 11 kann zur Lösung dieser Frage beitragen. Annähernd 80% der Radioaktivität im Serum erschienen als Äthinylöstradiolglukuronid. Ein Teil des Glukuronides wurde tatsächlich gespalten und erschien als Äthinylöstradiol. Ein weiterer Anteil wurde nach der Spaltung konjugiert zu Sulfat bzw. umgewandelt in einen unbekannten Metaboliten. Auch im Lumen ist nach 80 min ein beträchtlicher Teil des Äthinylöstradiolglukuronides gespalten und anschließend sulfatiert worden. Nach diesen Befunden könnte es einerseits sein, daß Äthinylöstradiolglukuronid langsam resorbiert wird, dabei in der Mucosazelle teilweise gespalten und rekonjugiert wird. Andererseits wäre es aber auch möglich, daß Äthinylöstradiol durch oberflächliche Glukuronidasen zunächst langsam in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gespalten wird, das anschließend aufgenommene Äthinylöstradiol rasch und nahezu vollständig konjugiert wird und die Konjugate dann wieder sowohl zur Blutseite, sowie zur Lumenseite hin die Mucosazelle verlassen.

3. 1. 2. 2. 4. Konjugation in Abhängigkeit von der Magenentfernung

In 16 Versuchen zur Resorption und Konjugation von Äthinylöstradiol in der isolierten Darmschlinge wurden Darmschlingen verwendet, die zwischen 14 cm und 60 cm vom Magenausgang entfernt waren. Bei allen Versuchen lag die Resorptionsrate zwischen 43% und 83% in 70 min und der Anteil an Konjugaten im Serum betrug zwischen

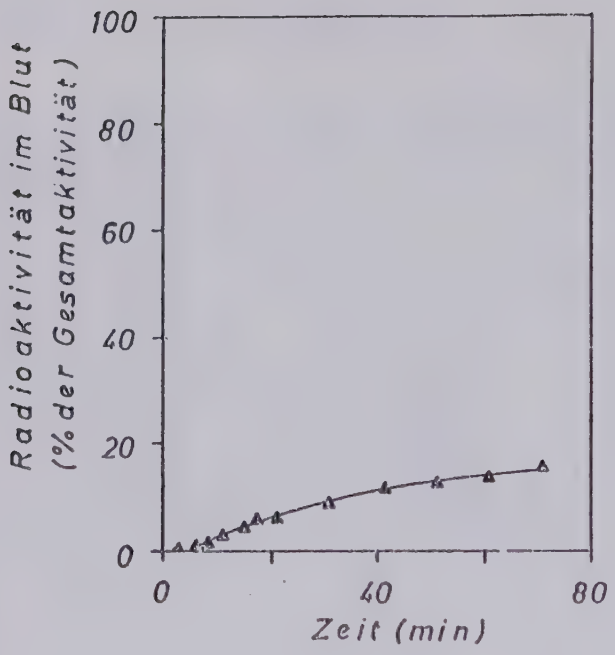


Abb. 12 : RESORPTION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL-GLUKURONID IN DER ISOLIERTEN DARMSCHLINGE

In eine isolierte Darmschlinge (Länge 3cm, Magenentfernung 53cm) einer 340g schweren Ratte wurden 0,5ml einer 40nM Lösung von Äthinylöstradiolglukuronid eingefüllt. Das venöse Blut wurde quantitativ gesammelt und die Radioaktivität im Blut über 75 min bestimmt. Gesamtaktivität ist die ins Lumen verabreichte Aktivität.

40% und 71% der Radioaktivität im Serum. Man kann wohl sagen, daß die Konjugationsrate nur relativ geringe Unterschiede in den verschiedenen Dünndarmabschnitten aufweist. Auch der Anteil an Äthinylöstradiol, der in der Lymphe erschien, war zu etwa 16% konjugiert.

3. 1. 2. 2. 5. Konjugation in Abhängigkeit von der Äthinylöstradiolkonzentration

Nicht nur Resorption, sondern auch Konjugation von Äthinylöstradiol waren praktisch auch unabhängig von der Konzentration an Äthinylöstradiol im Lumen. Wie die Abb. 6 zeigt, wurde Äthinylöstradiol bei einer hohen Konzentration von 2mM langsamer resorbiert (68%), als bei einer niedrigen Konzentration von 40nM (92%). Außerdem war das Ausmaß der Konjugation geringer (42%) als bei der niedrigen Konzentration (64%).

3. 2. Isolierter Darmsack

3. 2. 1. Resorption und Konjugation im isolierten Darmsack

Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Resorption und Konjugation von Äthinylöstradiol im isolierten Darmsack. Äthinylöstradiol wurde ins Lumen d.h. auf die Mucosaseite hin verabreicht. Der untere Teil der Abbildung zeigt, daß das Äthinylöstradiol sehr schnell aus dem Lumen verschwindet. Nach 5 min sind nur noch 30% der verabreichten Dosis im Darmlumen, und dieser Anteil fällt weiter ab. Im Darmlumen erscheint gleichzeitig langsam konjugiertes Äthinylöstradiol. Der größte Anteil des Äthinylöstradiols ist aber in die Darmwand aufgenommen worden (mittlere Abb.). Auch in der Darmwand wird Äthinylöstradiol langsam konjugiert. Schließlich wandert ein Anteil von etwa 15% durch die Darmwand hindurch zur Serosaseite und erscheint im Außenmedium. Bei diesem Anteil liegen etwa 2/3 in der

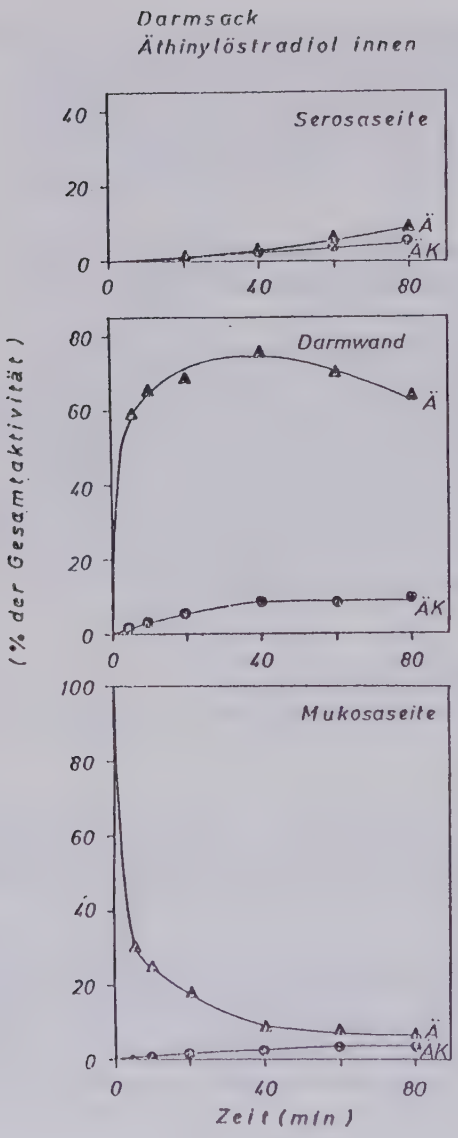


Abb. 13: RESORPTION UND METABOLISMUS VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IM ISOLIERTEN DARMSACK

6 Darmsäcke von je 3 cm Länge wurden aus dem Dünndarm (30-48cm vom Magen entfernt) gebildet. Gewicht der Ratte: 246g. In das Darmsacklumen wurden 0,5ml einer 200nM Lösung von 3H-Äthinylöstradiol in 0,9% NaCl-Lösung gefüllt (Inhalt) Der Darmsack wurde in 3ml Leibovitz-Medium unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In den angegebenen Zeiten wurde je eine Inkubation abgebrochen und die Aktivitätsverteilung zwischen Medium, homogenisierter Darmwand und Inhalt gemessen. Dabei wurde in allen 3 Kompartimenten zwischen wasserlöslichen Konjugaten (ÄK) und freiem Äthinylöstradiol (Ä) unterschieden. Je 6 Meßpunkte übereinander ergeben die eingesetzte Gesamtaktivität (100%).

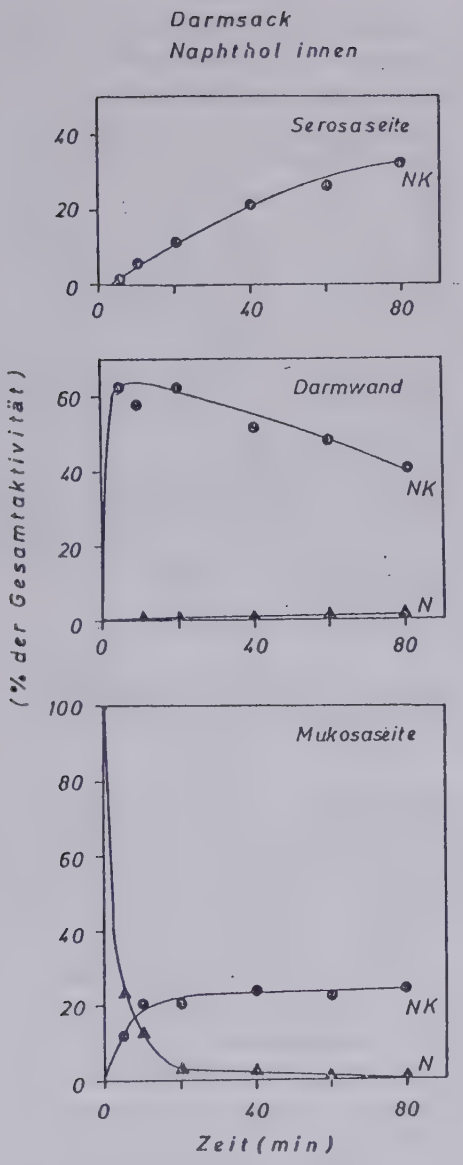


Abb. 14: RESORPTION UND METABOLISMUS VON NAPHTHOL IM ISOLIERTEN DARMSACK

6 Darmsäcke von je 3 cm Länge wurden aus dem Dünndarm (30-48cm vom Magen entfernt) gebildet. Gewicht der Ratte 250 g. In das Darmsacklumen wurden 0,5ml einer 200nM Lösung von ^{14}C-Naphthol in 0,9% NaCl-Lösung eingefüllt (Inhalt). Der Darmsack wurde in 3ml Leibovitz-Medium unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In den angegebenen Zeiten wurde je eine Inkubation abgebrochen und die Aktivitätsverteilung zwischen Medium, homogenisierter Darmwand und Inhalt gemessen. Dabei wurde in allen 3 Kompartimenten zwischen wasserlöslichen Konjugaten (NK) und freiem Naphthol (N) unterschieden. Je 6 Meßpunkte übereinander ergeben die eingesetzte Gesamtaktivität (100%).

konjugierten Form vor. Der Versuch zeigt also, daß Äthinylöstradiol sehr stark an das Darmwandmaterial gebunden wird. Weiter, daß ein Teil des Äthinylöstradiols durch die Darmwand hindurch auf die Serosaseite gelangt. Schließlich, daß der Darmsack Äthinylöstradiol konjugieren kann und daß Konjugate zu etwa gleichen Mengen zur Mucosaseite und zur Serosaseite abgegeben werden. Abb. 14 zeigt einen entsprechenden Versuch mit Naphthol als Substrat. Nach 5 min finden sich nur noch 23% des Naphthols auf der Mucosaseite. Naphthol ist von der Darmwand aufgenommen worden und dort komplett konjugiert worden. In der Darmwand findet sich praktisch nur Naphtholkonjugat. Das Konjugat wird dann sowohl zur Mucosaseite, allerdings nur bis zu einem maximalen Wert von etwa 22%, als auch kontinuierlich zur Serosaseite abgegeben. In diesem Falle ist nicht der Transport von Naphthol oder die Konjugation von Naphthol geschwindigkeitsbestimmend für das Erscheinen auf der Serosaseite, sondern die Abgabe von präformiertem Naphtholkonjugat zur Serosaseite hin.

3. 2. 2. Resorption und Konjugation am umgestülpten Darmsack

Qualitativ ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei der Verwendung des umgestülpten Darmsackes. Die wesentlichen Unterschiede, im Gegensatz zum nicht umgestülpten Darmsack, dürften sich dadurch ergeben, daß nun das Verteilungsvolumen auf der Mucosaseite sehr viel größer ist, als auf der Serosaseite. Äthinylöstradiol verschwindet daher nur wesentlich langsamer von der Mucosaseite und wird langsamer in die Darmwand aufgenommen. Konjugiertes Äthinylöstradiol wird überwiegend zur Mucosaseite hin abgegeben. Auch das Naphthol verschwindet beim umgestülpten Darmsack langsamer aus dem mucosaseitigem Medium als beim nicht umgestülpten Darmsack. Naphthol, das in die Darmwand aufgenommen wurde, wird vollständig konjugiert und nur Konjugate erreichen die Serosaseite. Der größte

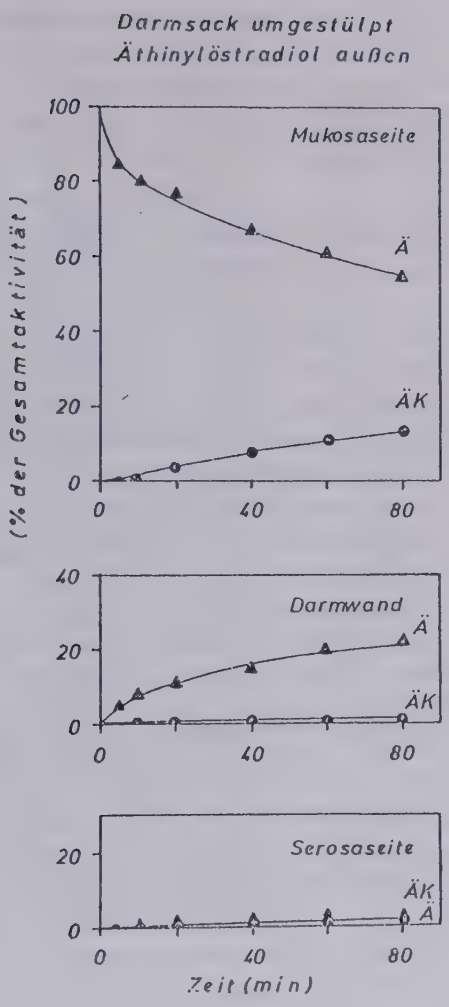


Abb. 15: RESORPTION UND METABOLISMUS VON ÄTHINYLÖSTRADIOL AM UMGESTÜLPTEN ISOLIERTEN DARMSACK

6 umgestülpte Darmsäcke von je 3 cm Länge wurden aus dem Dünndarm (30-40cm vom Magen entfernt) gebildet. Gewicht der Ratte: 230g. In das Lumen (Serosaseite) wurden 0,5ml Leibovitz-Medium eingefüllt (Inhalt). Der Darmsack wurde in 3ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen, der 30nM an ^{3}H-Äthinylöstradiol war und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In den angegebenen Zeiten wurden je eine Inkubation abgebrochen und die Aktivitätsverteilung zwischen Medium, homogenisierter Darmwand und Inhalt gemessen. Außerdem wurde in allen 3 Kompartimenten zwischen wasserlöslichen Konjugaten (ÄK) und freiem Äthinylöstradiol (Ä) unterschieden. Je 6 Meßpunkte übereinander ergeben die eingesetzte Gesamtaktivität (100%).

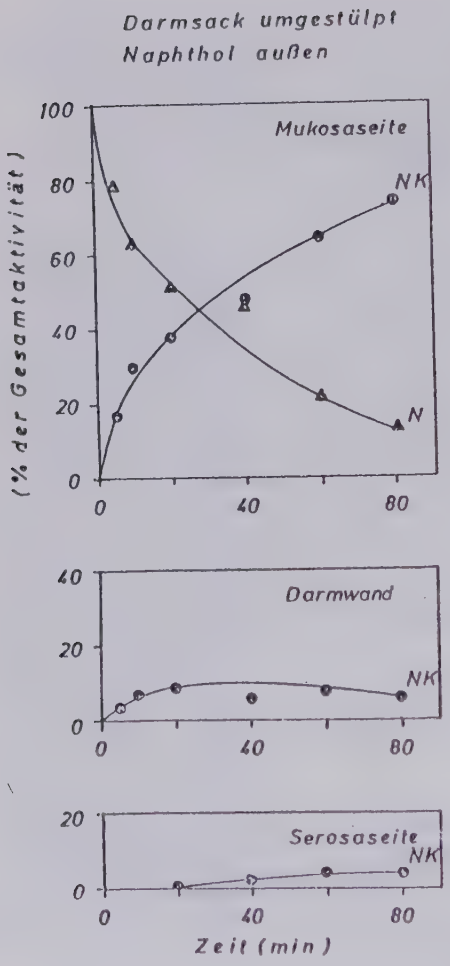


Abb. 16: RESORPTION UND METABOLISMUS VON NAPHTHOL AM UMGESTÜLPTEN ISOLIERTEN DARMSACK

6 umgestülpte Darmsäcke von je 3 cm Länge wurden aus dem Dünndarm einer 260g schweren Ratte (30-40cm vom Magen entfernt) gebildet. In das Lumen (Serosaseite) wurden 0,5ml Leibovitz-Medium eingefüllt (Inhalt). Der Darmsack wurde in 3ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen, die 30nM an ^{14}C-Naphthol war und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In den angegebenen Zeiten wurde je eine Inkubation abgebrochen und die Aktivitätsverteilung zwischen Medium, homogenisierter Darmwand und Inhalt gemessen. Dabei wurde in allen 3 Kompartimenten zwischen wasserlöslichen Konjugaten (NK) und freiem Naphthol (N) unterschieden. Je 4 übereinander liegende Meßpunkte ergeben die eingesetzte Gesamtaktivität (100%).

Teile der Konjugate wird allerdings zur Mucosaseite hin abgegeben. Ein Vergleich zwischen dem nicht umgestülpten und dem umgestülpten Darmsack zeigt, daß bei beiden Methoden qualitativ ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Jedoch gibt es deutliche quantitative Unterschiede.

3. 2. 3. Resorption und Konjugation von Äthinylöstradiolglukuronid am umgestülpten Darmsack

Schließlich wurde noch die Umwandlung von Äthinylöstradiolglukuronid am umgestülpten Darmsack untersucht. Die Verbindung verschwindet langsam von der Mucosaseite; gleichzeitig erscheint freies Äthinylöstradiol auf der Mucosaseite. In der Darmwand findet man sowohl Äthinylöstradiol alsauch Äthinylöstradiolglukuronid. Auf der Serosaseite erschien nur weniger als 2% der Gesamtaktivität und zwar als Äthinylöstradiolglukuronid. Der Versuch zeigt klar, daß Äthinylöstradiolglukuronid in der Darmwand hydrolysiert werden kann. Ob jedoch das Glukuronid primär in die Mucosazellen aufgenommen und dort hydrolysiert wird, oder ob eine extrazelluläre Hydrolyse Voraussetzung für die Aufnahme des (lipophilen) Äthinylöstradiols ist, das dann zum Teil wieder konjugiert werden kann, läßt sich aus diesen Versuchen nicht bestimmen.

3. 3. Isolierte Darmstücke

Da die Darmsäcke Äthinylöstradiol und Naphthol effektiv konjugieren können, wurde versucht, das experimentelle System zur Untersuchung der intestinalen Konjugation weiter zu vereinfachen durch die Benutzung umgestülpter, aber nicht abgebundener, Darmstücke. Da sich Darmstücklänge und Inkubationsbedingungen exakt einstellen lassen, schien es sinnvoll die Konjugationsrate in Abhängigkeit von der Magenentfernung der Dünndarmsegmente zu untersuchen. Abb. 18 zeigt die Konjugationsraten von Äthinylöstradiol und Naphthol jeweils in 12 verschiedenen Darm-

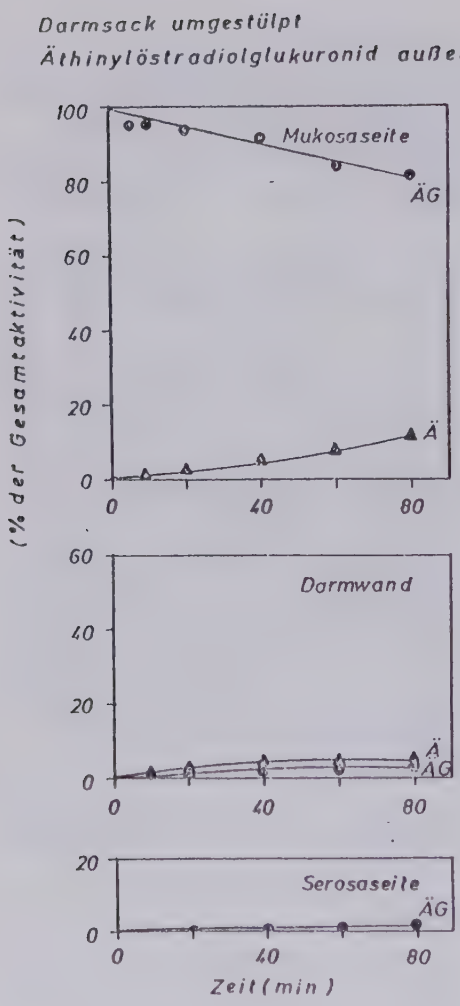


Abb. 17: RESORPTION UND HYDROLYSE VON ÄTHINYLÖSTRADIOL-GLUKURONID AM UMGESTÜLPTEN ISOLIERTEN DARMSACK

6 umgestülpte Darmsäcke von je 3 cm Länge wurden aus dem Dünndarm (30-40cm vom Magen entfernt) einer 238g schweren Ratte gebildet. In das Lumen (Serosaseite) wurden 0,5ml Leibovitz-Medium eingefüllt (Inhalt). Der Darmsack wurde in 3ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen, der 30nM an Äthinylöstradiolglukuronid war, und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. In den angegebenen Zeiten wurde je eine Inkubation abgebrochen und die Aktivitätsverteilung zwischen Medium, homogenisierter Darmwand und Inhalt gemessen. Dabei wurde in allen 3 Kompartimenten zwischen wasserlöslichen Konjugaten (ÄG = Äthinylöstradiolglukuronid) und freiem Äthinylöstradiol (Ä) unterschieden. Je 5 übereinander liegende Meßpunkte ergeben die eingesetzte Gesamtaktivität (100%).

stücken mit zunehemender Entfernung vom Magen. Beim Äthinylöstradiol scheint im Bereich zwischen 33cm und 45cm hinter dem Magen die Konjugation ihre größte Aktivität zu haben. Allerdings ist beim Naphthol ein entsprechendes Optimum nicht deutlich vorhanden. In vier verschiedenen Versuchsreihen zeigte sich, daß die Reproduzierbarkeit sehr unbefriedigend war. Deswegen wurde als weiteres Kriterium für die Brauchbarkeit dieses experimentellen Systems die Konjugationsfähigkeit in Abhängigkeit von der Darmstücklänge untersucht. Beim Äthinylöstradiol zeigte sich nur eine sehr geringe Abhängigkeit. In Übereinstimmung mit den später zu zeigenden Versuchen mit Darmhomogenat und Lebermikrosomen, wo ebenfalls die Menge an biologischem Material keinen linearen Einfluß auf die Konjugationsrate hatte. Beim Naphthol bestand eine deutliche Abhängigkeit der Konjugationsrate von der Darmstücklänge. Während jedoch die Darmstücklänge um das 20fache stieg, beschleunigte sich die Konjugationsrate nur um weniger als das 5fache. Dies könnte zum Teil darin begründet sein, daß bei diesen Untersuchungen Konjugate nur im Medium nicht aber im Darmstück selbst untersucht wurden. Es wäre also denkbar, daß bei zunehmender Darmstücklänge zunehmend mehr konjugiertes Naphthol im Darmstück selbst eingeschlossen bleibt und damit für die Messung nicht zugänglich ist. In den Inkubaten bestand auch bei den großen Darmstücken kein Sauerstoffmangel.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das experimentelle Modell "isoliertes Darmstück" für Untersuchungen der Biotransformation nicht geeignet ist.

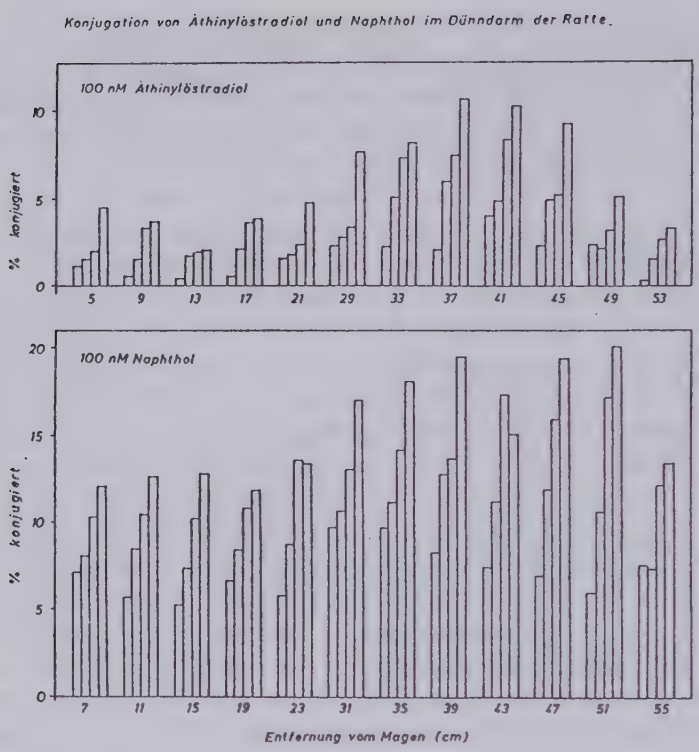


Abb.18 : KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL UND NAPHTHOL IM DÜNNDARM DER RATTE

Der Darm einer 260g schweren Ratte wurde in 24 Stücke von je 1cm Länge geschnitten, beginnend am Ende des Duodenums. Jedes Darmstück wurde getrennt in 3ml Leibovitz L 15-Medium bei 37°C unter Rühren und Sauerstoffbegasung inkubiert. Dann wurde ^{14}C-Naphthol (100nM) bzw. ^{3}H-Äthinylöstradiol (100nM) zugegeben. Nach 10,20,30 und 40min wurden je 200ml Medium entnommen und mit 200ul Chloroform extrahiert. Die zusammenhängende Säulenreihe gibt jeweils den wasserlöslichen Anteil der 4 Zeitwerte einer Inkubation wieder. Die Zahlen unter den Säulen geben die Entfernung vom Magen in cm an. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von vier identischen Versuchen.

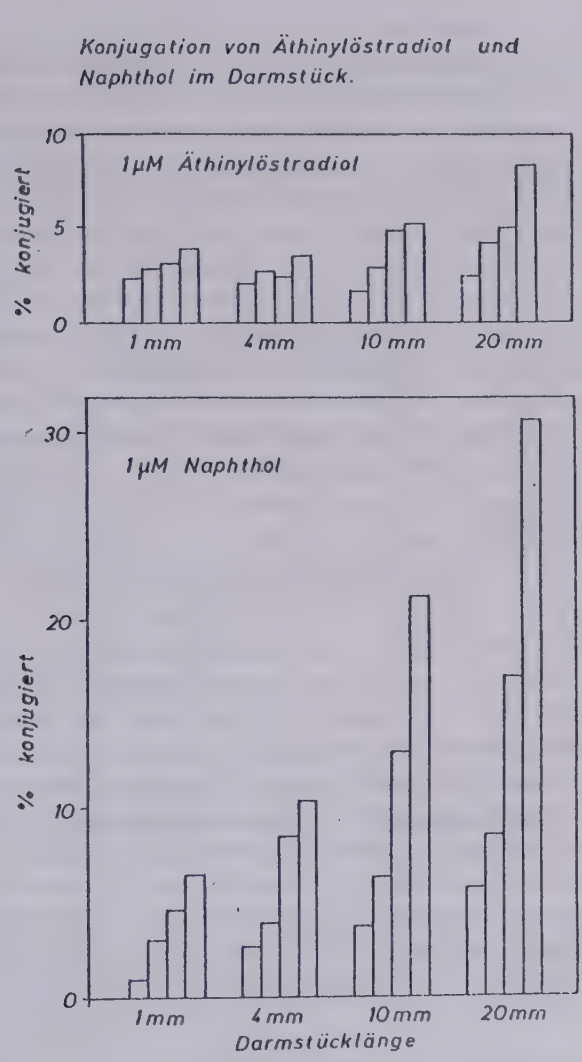


Abb. 19: KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL UND NAPHTHOL IM DARMSTÜCK

Aus dem Jejunum einer Ratte (240g schwer) wurden je 2 Darmstücke mit den Längen 1,4,10,20mm abgeschnitten (20-27cm vom Magen entfernt) und in 3ml Leibovitz L15-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde ^{3}H-Äthinylöstradiol (1uM Endkonzentration) bzw. ^{14}C-Naphthol (1uM Endkonzentration) zugegeben. Nach 10,20,30 und 40min wurden je 200ul Medium entnommen und mit 200ul Chloroform extrahiert. Die wasserlöslichen Anteile bei diesen Zeiten sind jeweils als zusammengehörige Säulenreihen dargestellt.

3. 4. Darmhomogenat

3. 4. 1. Abhängigkeit von der Darmhomogenatmenge

Abb. 20 zeigt die Abhängigkeit der Glukuronidierungsrate von der Menge an Darmhomogenat. Beim Naphthol nimmt die Anfangsgeschwindigkeit der Glukuronidierung (in der 1.ten Minute) proportional zu der Menge an eingesetztem Homogenat zu. Dagegen ergibt sich beim Äthinylöstradiol bei einer Verzehnfachung der Homogenatmenge nur eine Verdoppelung der Anfangsgeschwindigkeit. Diese geringe Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Enzymmenge bei Überschuß von Cosubstrat ist ungewöhnlich und könnte durch Anwesenheit kompetitierender Substanzen oder durch Anwesenheit von Glukuronidasen im Darmhomogenat verursacht sein.

3. 4. 2. Glukuronidierung in Lebermikrosomen

Um solche Einflüsse auszuschließen wurde die Glukuronidierung in isolierten Lebermikrosomen untersucht. Wie Abb. 21 zeigt ergab sich auch hier im Falle der Naphtholglukuronidierung eine lineare Abhängigkeit von der Menge an Lebermikrosomen. Bei der Glukuronidierung von Äthinylöstradiol jedoch eine ungewöhnlich geringe Abhängigkeit. Dies könnte dafür sprechen, daß die freie Konzentration Äthinylöstradiols, die für die Glukuronidierung verfügbar ist durch vermehrte Bindung des Substrates an die Lebermikrosomen etwa im gleichen Maße vermindert wird, wie die Menge an Enzym zunimmt.

3. 4. 3. Einfluß von Saccharolacton und Trypsininhibitor

Es ist allerdings noch nicht ausgeschlossen, daß im Darmhomogenat dennoch Glukuronidasen neu gebildetes Glukuronid wieder spalten können oder Proteasen die Aktivität in Anwesenheit üblicher Konzentrationen des Glukuronid-

Glukuronidierung von Naphthol und Äthinylöstradiol im Darmhomogenat. Abhängigkeit von der Homogenatmenge.

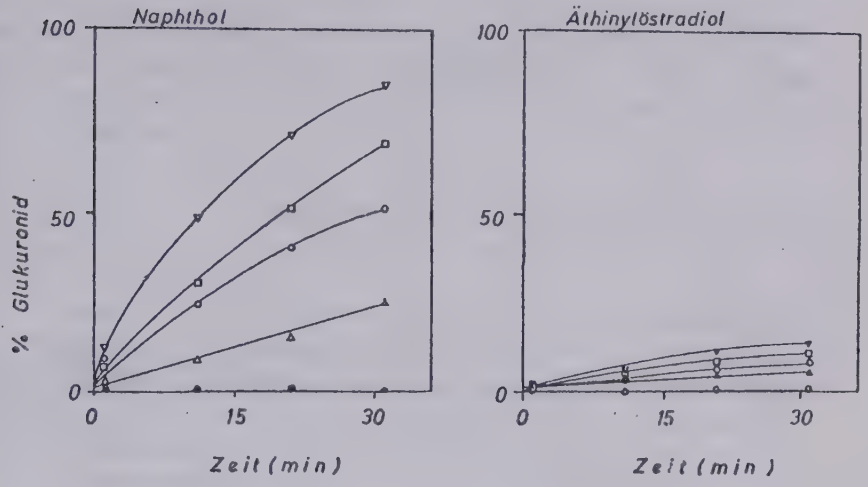


Abb. 20: GLUKURONIDIERUNG VON ^{14}C-NAPHTHOL UND ^{3}H-ÄTHINYLÖSTRADIOL IM DARMHOMOGENAT. ABHÄNGIGKEIT VON DER HOMOGENATMENGE

Homogenat vom Dünndarm einer 260g schweren Ratte wurde in 500ul Tris·HCl-Medium aufgenommen und bei 37°C unter Rühren inkubiert. Dann wurde ^{14}C-Naphthol (50uM) bzw. ^{3}H-Äthinylöstradiol (1uM), sowie UDPGA (3mM) zugegeben. Nach 1,11,21 und 31min wurden je 100ul Suspension entnommen und mit 100ul Chloroform extrahiert. Folgende Homogenatmengen wurden eingesetzt:
0mg Protein (●), 0,12mg Protein (△), 0,3mg Protein (○), 0,6mg Protein (□), 1,2mg Protein (▽).

Glukuronidierung von Naphthol und Äthinylöstradiol in Lebermikrosomen. Abhängigkeit von Mikrosomenmenge

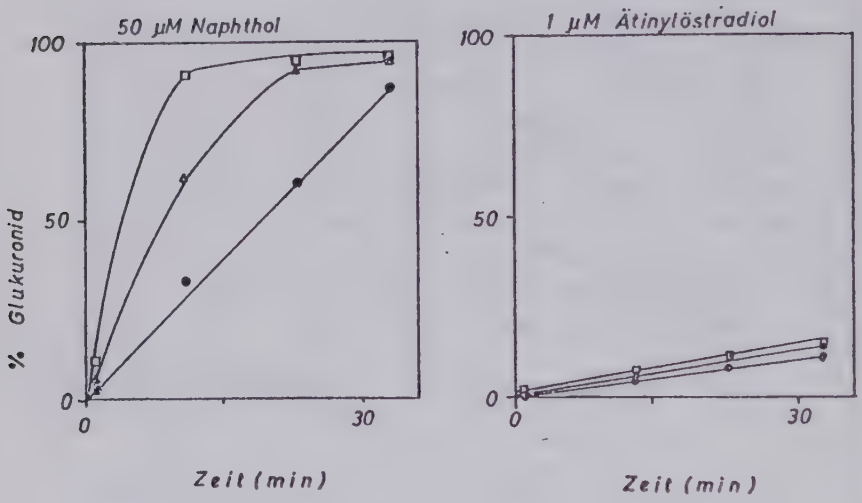


Abb. 21: GLUKURONIDIERUNG VON NAPHTHOL UND ÄTHINYLÖSTRADIOL IN LEBERMIRKROSOMEN

Lebermikrosomen wurden in 1ml Tris.HCl-Medium inkubiert. ^{14}C-Naphthol und ^{3}H-Äthinylöstradiol wurden zugegeben. Die Reaktion wurde mit UDPGA (3mM) gestartet. Nach 1,11, 21,31min wurden je 100ul entnommen und mit 100ul Chloroform extrahiert. Der wasserlösliche Anteil wurde aufgetragen. Der Schnittpunkt der Kurven mit der y-Achse gibt den Anteil an unverändertem Naphthol und Äthinylöstradiol an, der ins Wasser extrahiert wird. Verschiedene Mengen an Lebermikrosomen wurden verwendet:
0,3mg Protein (●), 0,75mg Protein (△), 1,5mg Protein (□).

asehemmers Saccharolacton bzw. in Anwesenheit eines Trypsininhibitors und unter Zusatz des SH-Schutzreagenz Dithiothreitol gemessen (Abb. 22, rechts).

Es zeigte sich aber in beiden Fällen nicht die erwartete Erhöhung der Glukuronidierungsrate, sondern eine weitere Erniedrigung, anscheinend durch direkte Wechselwirkungen der Inhibitoren mit der Glukuronyltransferasereaktion.

3. 4. 4. Abhängigkeit von der Äthinylöstradiolkonzentration

Auch die Abhängigkeit der Glukuronidierungsgeschwindigkeit von der Äthinylöstradiolkonzentration zeigt ein ungewöhnliches kinetisches Verhalten (Abb. 22, links). Im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-3}M führt eine Verzehnfachung der Konzentration etwa zur Halbierung der Reaktionsgeschwindigkeit, ohne daß eine Sättigung zu erkennen wäre.

3. 4. 5. Abhängigkeit der Glukuronidierungsrate von der Magenentfernung

Abb. 23 zeigt die Glukuronidierung von Äthinylöstradiol und von Naphthol in 6 verschiedenen Darmhomogenatfraktionen. Nur beim Äthinylöstradiol war in der Fraktion 40-50cm vom Magen entfernt eine höhere Glukuronidierung als in den restlichen Darmabschnitten. Für die Naphtholglukuronidierung war in keiner der Fraktionen ein Optimum vorhanden.

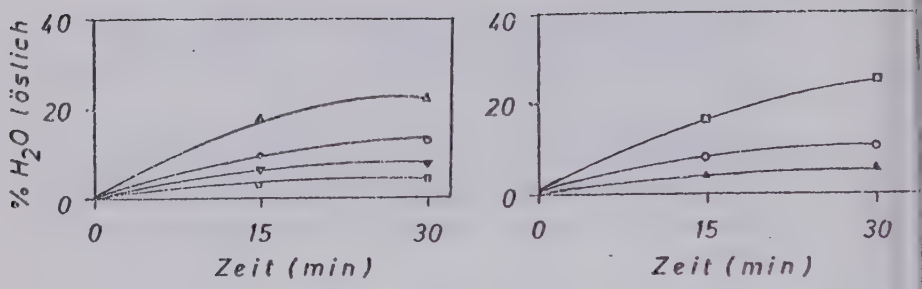


Abb. 22: GLUKURONIDIERUNG VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IM DARMHOMOGENAT

Darmhomogenat (0,5mg Protein) wurde in 500ul Tris·HCl-Medium aufgenommen und unter Rühren bei 37°C mit ^{3}H-Äthinylöstradiol versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von UDPGA (3mM Endkonzentration) gestartet. Nach 15 und 30min wurde je 100ul Suspension abgenommen und mit 100ul Chloroform denaturiert und extrahiert.

Rechte Abbildung: 10uM Äthinylöstradiol (□) +
10mM Saccharolacton (○) +
50ug Trypsin-Inhibitor +
100uM Dithiotreitol (△).

Linke Abbildung: Äthinylöstradiol 20nM (△), 2uM (○), 200uM (▽), 2mM (□).

Glucuronidierung von Äthinylöstradiol und Naphthol im Darmhomogenat.

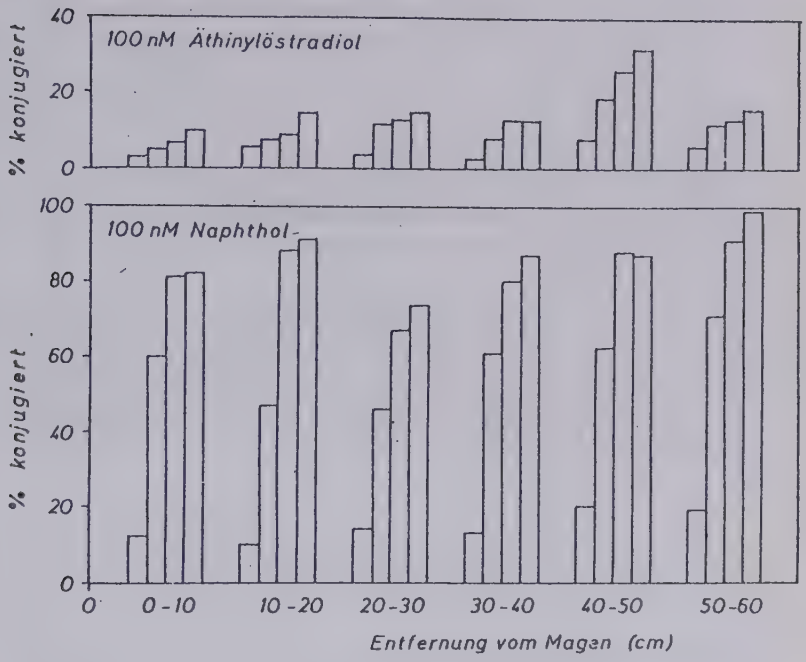


Abb. 23: GLUKURONIDIERUNG VON ÄTHINYLÖSTRADIOL UND NAPHTHOL IM DARMHOMOGENAT

Darmhomogenat (0,5mg Protein) wurde aus 6 verschiedenen Dünndarmabschnitten gewonnen und jeweils in 500ul Tris·HCl-Medium aufgenommen und unter Rühren bei 37°C mit ^{3}H-Äthinylöstradiol (10uM) versetzt. Nach 10,20,30 und 40min wurden je 100ul Suspension abgenommen und mit 100ul Chloroform extrahiert. Die 4 Stufen eines Säulenblocks repräsentieren den Anteil gebildeter Konjugate bei den 4 Zeitwerten einer Inkubation.

3. 5. Konjugation in isolierten Darmzellen

Der zeitliche Verlauf der Konjugation von Naphthol und Äthinylöstradiol in Suspensionen isolierter Darmzellen wurde durch Extraktion der wasserlöslichen Konjugate aus der Suspension bestimmt. Abb. 25 zeigt die Konjugation von Naphthol in isolierten Rattendarmzellen. Die Daten sollen hier nicht exakt kinetisch analysiert werden, sondern nur soweit beschrieben werden, als sie zeigen, daß Darmzellen geeignete Untersuchungsobjekte sind. Es besteht eine deutliche Abhängigkeit von den Naphtholkonzentrationen, von der eingesetzten Zellmenge und auch von der Reaktionstemperatur.

Wie schon vorher in Darmstücken und im Darmhomogenat, war auch bei isolierten Rattendarmzellen der Umsatz von Äthinylöstradiol wesentlich langsamer und im Bereich zwischen 0,1uM und 10uM nicht sichtbar konzentrationsabhängig (Abb. 24).

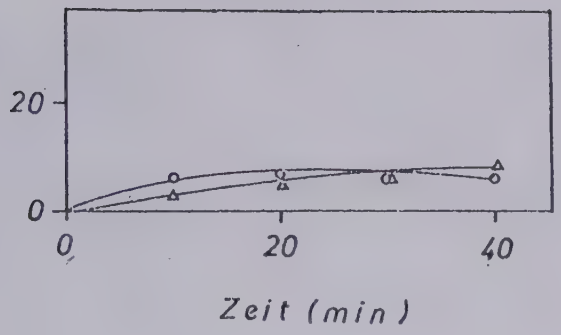


Abb. 24: KONJUGATION VON ÄTHINYLÖSTRADIOL IN ISOLIERTEN DARMZELLEN DER RATTE

Isolierte Mucosazellen (1,2mg Protein) vom Rattendarm wurden in 0,5ml Eagle-Medium unter Rühren bei 37°C inkubiert. 5ul 3H-Äthinylöstradiol wurden zum Zeitpunkt 0 zu einer Endkonzentration von 0,1uM (○) bzw. 10uM (△) zugegeben. Nach 10,20,30,40min wurden je 100ul Suspension aus dem Inkubat entnommen und mit 100ul Chloroform extrahiert. Der wasserlösliche Anteil entspricht etwa zu 95% dem Glukuronid von Äthinylöstradiol (dünnschichtchromatographisch, Glukuronidasespaltung).

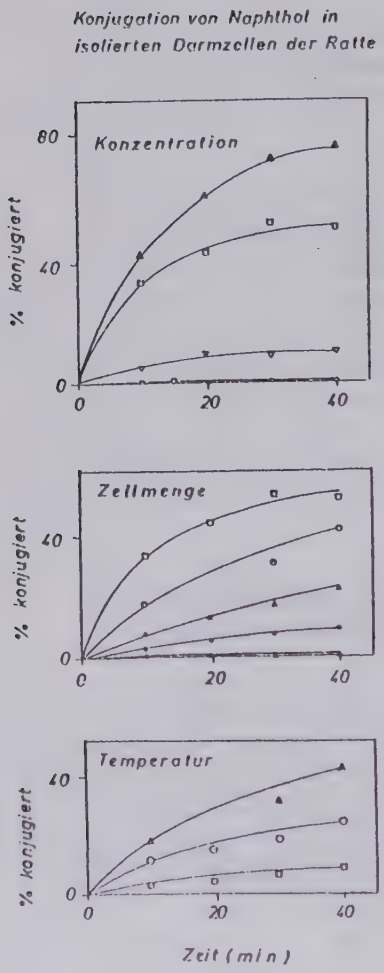


Abb. 25: KONJUGATION VON NAPHTHOL IN ISOLIERTEN DARMZELLEN DER RATTE

Isolierte Mucosazellen vom Rattendarm wurden in 0,5ml Eagle-Medium unter Rühren inkubiert. 5ul ^{14}C-Naphthol wurden zum Zeitpunkt 0 zugegeben. Nach 10,20,30 und 40 min wurden je 100ul Suspension aus dem Inkubat entnommen und mit 100ul Chloroform extrahiert. Der wasserlösliche Anteil entspricht etwa zu 95% dem Glukuronid von Naphthol (dünnschichtchromatographisch, Glukuronidasespaltung).

Obere Abb: Abhängigkeit von der Naphtholkonzentration

1uM (▲), 10uM (□), 1mM (▽), 10mM (○), 100mM (▼) Protein

Zellmenge: 0,8mg Protein 37°C

Mittlere Abb: Abhängigkeit von der Zellmenge

0mg (▲), 0,04mg (●), 0,12mg (△), 0,4mg (○), 0,8mg (□) Protein

Naphthol: 10uM, 37°C

Untere Abb: Abhängigkeit von der Temperatur

37°C (▲), 22°C (○), 0°C (□).

Protein: 0,4mg

Naphtholkonzentration 10u

4. DISKUSSION

4. 1. Gibt es einen intestinalen "first pass effect" von Äthinylöstradiol?

Verschiedene Pharmaka werden nach oraler Einnahme und intestinaler Resorption über das Pfortaderblut der Leber zugeführt und von der Leber bereits weitgehend zu pharmakologisch inaktiven Metaboliten umgewandelt. Diesen Prozeß bezeichnet man als "first pass effect" (21). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß nicht nur die Leber, sondern auch die Darmmucosa Fremdsubstanzen metabolisieren kann (intestinaler "first pass effect"). Zum Beispiel wird Tetrahydrocannabinol hydroxyliert (22); Hydralazin wird acetyliert (23); Perazin wird teilweise sulfoxydiert und hydroxyliert (24) und eine große Zahl von Phenolen wird konjugiert, so z.B. Östron mit Sulfat und Glukuronsäure (25) und 1-Naphthol vorwiegend mit Glukuronsäure (26).

Die vorliegenden Ergebnisse zur intestinalen Metabolisierung von Äthinylöstradiol zeigen, daß Äthinylöstradiol bei seiner Resorption am Steroidgerüst zu etwa 2% hydroxyliert wird, außerdem entsteht in geringen Mengen ein bisher nicht identifizierter Metabolit. Etwa 46% des resorbierten Äthinylöstradiols erschienen in Form von Konjugaten, insbesondere des Glukuronides. Der Befund von Meli et al. 1968 (27), daß Äthinylöstradiol im Darm nicht metabolisiert wird, ist also falsch. Dagegen bestätigen die vorliegenden Ergebnisse eine Arbeit von Back et al. (9), die kürzlich veröffentlicht wurde. Die Arbeitsgruppe fand, daß Äthinylöstradiol im isolierten Darmsack am Steroidgerüst nicht verändert, aber glukronidiert wird. Jedoch fehlten bisher Untersuchungen zur Resorptionsgeschwindigkeit und der Konjugationsrate unter in vivo Bedingungen. Auch wurden Stofftransporte zur Lumenseite hin bisher nicht untersucht.

Da resorbiertes Glukuronid durch ß-Glukuronidasen des

Körpers wieder zu freiem Äthinylöstradiol gespalten werden kann, kann man sagen, daß dieses Östrogen bei der Resorption seine hormonelle Aktivität behält. Die Konjugation dürfte sich jedoch auf die Pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz niederschlagen. Bereits im intestinalen Kapillarblut verteilt sich das freie Äthinylöstradiol überwiegend in die Blutzellen, Äthinylöstradiolglukuronid aber ins Plasma.

In Analogie zur geringen hepatischen Aufnahme von Östronsulfat im Vergleich zu Östron (28), könnte Äthinylöstradiolglukuronid bei der Leberpassage weniger in die Leberzellen aufgenommen werden, als die unkonjugierte Verbindung; und schließlich wird das Verteilungsvolumen des Glukuronides wesentlich kleiner sein, als das des freien Äthinylöstradiols. Es ist also denkbar,daß der intestinale "first pass effect" von Äthinylöstradiol nicht die Bioverfügbarkeit des Hormons erniedrigt, sondern durch Erhöhung des Plasmaspiegels die Bioverfügbarkeit erhöht. Denn die Zielorgane können konjugiertes Östrgen aus dem Blut aufnehmen und hydrolysieren (29).

Intestinale Resorption und biläre Elimination können als zwei spiegelbildliche Prozesse aufgefaßt werden, da in beiden Fällen eine transzelluläre Passage der Substanz, eventuell mit metabolischer Umwandlung, stattfindet.

Es wäre interessant, die transzelluläre Transportgeschwindigkeit von Äthinylöstradiol durch die Darmmucosazelle und durch Hepatozyten, sowie das Ausmaß der Metabolisierung zu vergleichen. Leider liegen keine Daten über biläre Elimination von Äthinylöstradiol an der isoliert perfundierten Rattenleber vor. Es ist aber bekannt, daß Äthinylöstradiol bzw. seine Metaboliten nach i.v. Injektion in die ganze Ratte, innerhalb von zwei Stunden 57% bilär erscheint und davon liegen 97% in konjugierter Form vor (30). Allerdings werden nur etwa 9% als Äthinylöstradiolglukuronid wiedergefunden (31), beim Rest ist das Steroidgerüst durch 2-Hydroxylierung und

andere Reaktionen verändert worden (7;Seite 133).

Über die Glukuronidierungsaktivitäten des Dünndarmes in Abhängigkeit von der Magenentfernung liegen verschiedene Daten vor. Hännien et al. (32) fanden, daß die Glukuronidierung von o-Aminophenol vom Duodenum bis zum terminalen Ileum ständig abnimmt. Dagegen beschrieben Back et al. (10) ein Glukuronidierungsoptimum für Äthinylöstradiol im Bereich des mittleren Ileums. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ein Aktivitätsmaximum in diesem Bereich nur andeutungsweise. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen besteht darin, daß die intestinale Glukuronidierung durch eine Vielzahl von Mechanismen beeinflußt wird (33). Unter anderem wird die Enzymaktivität durch Komponenten der Diät reguliert. Möglicherweise liegen dem hier beobachteten Verteilungsmuster diätetische oder andere regulatorische Unterschiede zugrunde (34).

Bis hierher wurden nur die Metabolite von Äthinylöstradiol, die nach der Resorption im Blut erschienen, betrachtet.

Ein interessantes Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht darin, daß Äthinylöstradiolkonjugate auch auf der Lumenseite zu finden sind. Da der Lumeninhalt selbst nicht in der Lage war, Äthinylöstradiol zu konjugieren, muß man annehmen, daß die Konjugate in der Mucosazelle gebildet und dann wieder eliminiert wurden. Ähnliche Beobachtungen wurden früher beim Naphthol gemacht (12). Neu ist jedoch der Befund, daß Glukuronide und Sulfate asymmetrisch über die Mucosazelle verteilt werden. Das Glukuronid kann sowohl zum Blut, wie zum Lumen hin abgegeben werden (Abb. 26). Das Sulfat wird aber ganz überwiegend in das Lumen abgegeben und reichert sich dort im Laufe der Zeit an (Abb. 26).

Eine ähnliche asymmetrische Verteilung von Östrogenkonjugaten wurde bei der Leberzelle beobachtet. Die Sulfate natürlicher Östrogene werden bevorzugt zum Blut hin abgegeben, während die Glukuronide bevorzugt in der

Intestinaler "first pass effect" von
Äthinylöstradiol und Äthinylöstradiolglucuronid

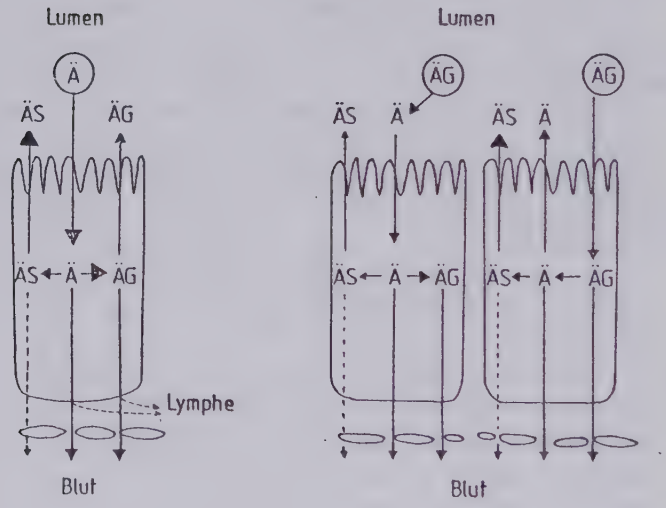


Abb. 26: INTESTINALER "FIRST PASS EFFECT" VON
ÄTHINYLÖSTRADIOL UND ÄTHINYLÖSTRADIOLGLUKURONID

Erklärung siehe Text

Galle erscheinen (28). Es wäre denkbar, daß Transportsysteme in der Zellmembran diese Verteilung steuern. Lauterbach (35) nahm an, daß g-Strophantin von Mucosazellen aktiv ins Lumen abgegeben werden kann, und sieht darin die Erklärung für dessen geringe Resorptionsrate. Ob die Abgabe von Äthinylöstradiolsulfat ins Darmlumen unter in vivo Bedingungen die Resorption abschwächt, wie von Barr et al. im Falle des Salicylamid (36) diskutiert, oder ob bakterielle Sulfatasen diesen Prozeß rasch wieder rückgängig machen, kann momentan nicht entschieden werden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß etwa 46% des resorbierten Äthinylöstradiols einem intestinalen "first pass effect" unterlagen. Dieser Effekt dürfte jedoch nicht zu einer verminderten pharmakologischen Aktivität führen. Ein Teil der Konjugate wird in das Darmlumen abgegeben, wodurch die Reabsorption erschwert wird.

4. 2. Ist ein enterohepatischer Kreislauf von Äthinylöstradiolglukuronid möglich?

Obwohl viele Fremdstoffe in glukuronidierter Form über die Galle in den Darm abgegeben werden, ist über die Reabsorption der Glukuronide wenig bekannt. Im allgemeinen wird angenommen, daß Glukuronide dann, wenn sie wieder resorbiert werden, vorher durch bakterielle ß-Glukuronidasen gespalten werden müssen (31). Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurden etwa 10% des resorbierten Äthinylöstradiolglukuronides hydrolysiert. Der hohe Anteil von 80% Glukuroniden im Serum spricht dafür, daß Äthinylöstradiolglukuronid als solches aufgenommen werden kann. Dies entspricht früheren Beobachtungen, daß Sulfatester von Steroidhormonen unverändert resorbiert werden können (37). Glukuronide von Androstenolon (38) dagegen werden im Darm weitgehend hydrolysiert und dann zu 70% mit Schwefelsäure konju-

giert, bevor sie im Blut erscheinen. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wird Äthinylöstradiolglukuronid zum Teil umkonjugiert; das neu gebildete Sulfat wird jedoch vorwiegend ins Darmlumen abgegeben.

Leider läßt auch der Versuch mit umgestülpten Darmsäcken keine eindeutige Interpretation des Mechanismus der Aufnahme zu. Zwar erscheint auf der Mucosaseite des Darmes mit der Zeit zunehmend mehr Äthinylöstradiol, aber dieses kann sowohl durch extrazelluläre (an der Zelloberfläche), als auch durch intrazelluläre Spaltung entstanden sein. Der Anteil an konjugiertem Äthinylöstradiol in der Darmwand ist größer als bei Applikation von freiem Äthinylöstradiol, jedoch spricht das nicht unbedingt für eine Aufnahme des Glukuronides: Es wäre auch denkbar, daß das Glukuronid extrazellulär in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt langsam gespalten wird und nach Diffusion ins Zellinnere eine geringe Menge Äthinylöstradiol relativ schneller intrazellulär konjugiert werden kann.

Löffler und Bolt (31) haben gezeigt, daß etwa 15% einer i.v. verabreichten Dosis von Äthinylöstradiol in Form von Äthinylöstradiolglukuronid in die Rattengalle abgegeben wird. Diese stehen prinzipiell dem enterohepatischen Kreislauf zur Verfügung. In den vorliegenden Ergebnissen wurden innerhalb von 40min 10% des Äthinylöstradiolglukuronides resorbiert. Läßt man einmal den intestinalen Metabolismus von Äthinylöstradiolglukuronid außer Betracht, so könnte die bilär ausgeschiedene Menge von Äthinylöstradiolglukuronid nach etwa 400min zu 100% resorbiert werden. Allerdings sind bei dieser Überschlagsrechnung zusätzliche Faktoren, wie bakterielle ß-Glukuronidasen oder Anwesenheit von Gallensäuren (39), außer Betracht gelassen. Die Möglichkeit eines enterohepatischen Kreislaufes von Äthinylöstradiol wird bei der Ratte von vorne herein durch die geringe biläre Elimination des Äthinylöstradiolglukuronides (31) eingeschränkt, so daß Variationen der intestinalen Reabsorp-

tion nur einen geringen Einfluß auf den Plasmaspiegel haben sollten.

4. 3. Warum folgt Äthinylöstradiol nicht einer normalen Kinetik?

Die Konjugation von Äthinylöstradiol zeigte verschiedene ungewöhnliche Eigenschaften. Sowohl in Lebermikrosomen, als auch im Darmhomogenat schlug sich eine Vermehrung des biologischen Materials nur unwesentlich in der Glukuronidierungsgeschwindigkeit nieder (Abb. 21/22). Dieselbe Beobachtung wurde am Darmstück gemacht (Abb. 19). Weiter war die Konjugation im Darmhomogenat nicht proportional zur Äthinylöstradiolkonzentration, obwohl noch keine Sättigung eingetreten war (Abb. 22). Im Ganztier wurden in dem weiten Konzentrationsbereich zwischen 20nM und 2mM Äthinylöstradiol im Darmlumen jeweils zwischen 65% und 45% des resorbierten Äthinylöstradiols glukuronidiert. Eine Sättigung der Glukuronidierungsrate, wie sie für Salicylamid beschrieben wurde (36), wurde also nicht erreicht. Damit ist Äthinylöstradiol im Grunde für biochemische Analysen ein gänzlich ungeeignetes Substrat, und aus diesem Grunde wurde in die vergleichende Untersuchung Naphthol miteinbezogen. Beim Naphthol bestand in allen Systemen weitgehend eine Konzentrationsabhängigkeit und eine Abhängigkeit von der Menge an biologischem Material, wie es erwartet wurde. Warum ist nun die Glukuronidierung von Äthinylöstradiol so anders?

Es ist bekannt, daß die Ratte mindestens 3 unterschiedliche Glukuronyltransferasen besitzt: Eine für das Substrat Naphthol, eine zweite für Morphin und eine dritte für Östrogene. Dadurch wird zum Teil verständlich, daß die Eigenschaften der Naphthol- und der Äthinylöstradiolglukuronidierung verschieden waren. Ein weiterer Grund könnte in den Eigenschaften von Äthinylöstradiol liegen. Äthinylöstradiol ist fast wasserunlöslich. Pipetiert man 5ul einer 1mM äthanolischen Lösung von Äthin-

ylöstradiol in 1ml Wasser, so kann man mit dem Auge gerade noch erkennen, daß die Substanz ausfällt, also bei einer Konzentration von 5uM. Weiter kann man beobachten, daß das Äthinylöstradiol bei dieser und bei viel höheren Konzentrationen nicht kristallin ausfällt, sondern daß sich gelartige Flocken bilden. Diese Flokkenbildung verändert das spektrale Verhalten von Äthinylöstradiol weder qualitativ noch quantitativ (Abb. 27) und macht sich nur als dem Spektrum aufgelagerte Trübung bemerkbar. Wird eine Lösung von Äthinylöstradiol in Chloroform mit dem gleichen Volumen an Wasser ausgeschüttelt, so gehen immer 4-6% des Äthinylöstradiols in die Wasserphase über, selbst dann, wenn die Löslichkeit in Wasser schon überschritten ist. Äthinylöstradiol hat also sehr ungewöhnliche Lösungseigenschaften und es wird vermutet, daß diese der Grund für das ungewöhnliche kinetische Verhalten sind. Die geringe Zunahme der Konjugationsgeschwindigkeit von Äthinylöstradiol bei der Vermehrung des biologischen Materials, könnte dann darauf beruhen, daß Äthinylöstradiol vermehrt an Lipide gebunden werden kann und damit für die Reaktion nicht mehr verfügbar ist, wie das qualitativ ähnlich für Östron beschrieben wurde (40).

4. 4. Welches experimentelle Modell eignet sich für Studien der intestinalen Resorption und Metabolisierung?

Zur Lösung pharmakologischer Fragestellungen stehen stets verschiedene experimentelle Modelle zur Verfügung. Die Hierarchie experimenteller Modelle umfaßt Versuchsmodelle vom Ganztier über das ganze Organ, Organstücke, isolierte Zellen, Organellen, wie Mikrosomen im Darmhomogenat und schließlich isolierte Enzymsysteme, die hier nicht verwendet wurden. Die verschiedenen Resorptionsmodelle werden gut beschrieben im "Handbook Of Physiology" (41) und "Pharmakology Of Intestinal Absorption" (42), sowie in

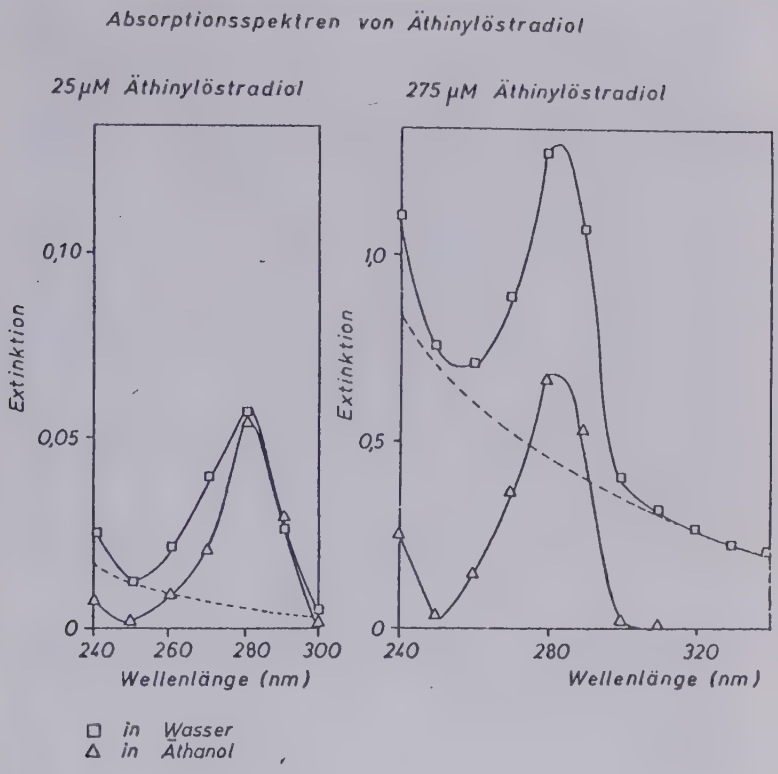


Abb. 27: ABSORPTIONSSPEKTREN VON ÄTHINYLÖSTRADIOL

In eine Quarzküvette wurden 2ml Wasser bzw. 2ml Äthanol eingefüllt. Dann wurden 5ul einer äthanolischen Lösung von Äthinylöstradiol zu den Endkonzentrationen 25uM bzw. 275uM zugegeben, umgerührt und die Extinktion am Zeiss-Spektral-Photometer manuell gemessen.

einer neueren Arbeit in "Gastrointestinal Absorption Of Drugs" (43).

Die physiologischen in vivo Bedingungen sind am besten gewahrt im Ganztierversuch, im vorliegenden Fall also in der isolierten Darmschlinge. Grundlegende Versuche zu diesem Modell wurden vom Pharmakologischen Institut in Tübingen durchgeführt. Der Ganztierversuch ist im allgemeinen relativ wenig aufwendig, weil keine Präraration biologischen Materials nötig ist und die Vorbereitung von Puffern, Inkubationsgefäßen u.s.w. entfällt. Allerdings erfordert die Operation viel Übung und Geschicklichkeit. Das Modell gibt die Verhältnisse in vivo wieder und liefert gute reproduzierbare Ergebnisse zur Resorption und Konjugation. Allerdings sind viele Variationen möglich. Zum Beispiel wurd im vorliegenden Schlingenversuch nicht berücksichigt, daß physiologischerweise Speisereste und Gallensäuren im Darmlumen anzutreffen sind und die Peristaltik stattfindet. Auch ist der Einfluß von Kreislaufparametern, intestinaler Innervation und Reaktion auf Hormone nicht ausschließbar. Schließlich bleiben bei Verwendung der isoliert geschlossenen Darmschlinge die zeitlichen Abläufe im Lumen und in der Darmwand verbogen, der Stoffwechsel im Darmlumen kann kontinuierlich untersucht werden, wenn die isoliert perfundierte Darmschlinge verwendet wird (Abb. 11).

Zur Ermittlung des zeitlichen Verlaufes der Vorgänge in der Darmwand ist der isolierte Darmsack geeignet. Der isolierte Darmsack war in der Lage, sowohl Naphthol, als auch Äthinylöstradiol zu transportieren und zu konjugieren. Äthinylöstradiol wurde durch die Darmwand aufgenommen und schließlich langsam konjugiert. Naphthol wurde durch die Darmwand aufgenommen und so rasch konjugiert, daß in der Darmwand praktisch nur Konjugate zu finden waren. Sowohl beim Naphthol, als auch beim Äthinylöstradiol spiegelte der nicht umgestülpte Darmsack die in vivo Bedingungen besser wieder, als der umgestülpte

Darmsack, denn beim nicht umgestülpten Darmsack wurde ein wesentlich größerer Anteil zur Serosaseite hin transportiert. Ein exakt quantitativer Vergleich mit der Darmschlinge ist jedoch nicht möglich, da ja beim Darmsack die Vaskularisierung verloren ging. Zwar spielt die Vaskularisierung für die Aufnahme lipophiler Substanzen, wie z.B. Harnstoff aus dem Lumen, keine Rolle (44),aber es muß mit einem abnehmenden Sauerstoffgradienten zur Gewebsmitte hin gerechnet werden. Außerdem müssen die Moleküle vor dem Erscheinen auf der anderen Seite die Darmwand einschließlich der Serosa durchwandern. Die vorliegenden Experimente mit isolierten Darmsäcken geben Aufschluß über die Spiegel unkonjugierter und konjugierter Verbindungen in der Darmwand, und waren sehr gut reproduzierbar. Sie haben allerdings nicht, wie erhofft, Rückschlüsse über den zeitlichen Ablauf von Resorption und Konjugation zugelassen.

Die Verwendung isolierter Darmstücke schien eine geeignete Methode um Enzymspiegel z.B. in Abhängigkeit von der Entfernung vom Magen vergleichen zu können. Jedoch war der Umsatz von Äthinylöstradiol in den Darmstücken so langsam, daß der Nachweis von Konjugaten Schwierigkeiten bereitete. Auch der Umsatz von Naphthol war schlecht reproduzierbar. Dies könnte daran liegen, daß die Darmzotten in dem Darmstück schlechter entfaltet und von ungerührten Mediumschichten umgeben waren, in denen sich hohe Konzentrationen von Konjugaten anreichern könnten (45). Zusammenfassend kann man sagen, daß sich Darmstücke als ungeeignet erwiesen haben.

Die Isolierung von Rattendarmzellen ist wegen der starken Bildung von Schleim problematisch. Deswegen gibt es Arbeitsgruppen, die Dünndarmzellen aus Hühnchen isolieren (46) und andere, die das Meerschweinchen bevorzugen (17). Die hier verwendete Methode liefert morphologisch gut aussehende Zellen, die in der Lage sind, ohne Zugabe von Cosubstrat zu glukuronidieren. Abb. 24/25 zeigt, daß in Rattendarmzellen Naphthol zwar gut,

Äthinylöstradiol aber sehr langsam konjugiert wurde. Die Abbildungen sollen demonstrieren, daß Darmzellen geeignete Modelle zur Untersuchung des intestinalen Fremdstoffmetabolismus sind. Zusätzlich ist zu hoffen, daß unter Anwendung isolierter Darmzellen auch Transportmechanismen, die zur Aufnahme von unkonjugierten und konjugierten Östrogenen in die Mucosazelle führen, untersucht werden können.

Im Darmhomogenat können prinzipiell alle metabolischen Reaktionen untersucht werden, wobei im Gegensatz zu den bisher genannten experimentellen Modellen kein Transportschritt über Zellmembranen die Kinetik stört. Mikrosomale Glukuronidierung wird gemessen durch Zugabe des Cosubstrates Uridindiphosphatglukuronsäure und mikrosomale Hydroxylierung durch Zugabe von NADPH. Die Cosubstrate werden im Überschuß zugegeben, können also nicht, wie in den anderen Modellen, begrenzend für die Reaktionsgeschwindigkeit sein. Jedoch hat die Verwendung von Darmhomogenat auch Nachteile. Endogene Substanzen können um das metabolisierende System konkurrieren; die mikrosomalen Enzyme verlieren meistens nach einigen Minuten Inkubationszeit an Aktivität. Glukuronidasen können gebildete Glukuronide wieder spalten. Schließlich kann der große Pool biologischen Materials erhabliche Mengen des Substrates binden und damit für den Umsatz nicht verfügbar machen. All diese Nachteile sind im Prinzip bei isolierten Mikrosomen ausgeschlossen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde auf die Isolierung von Darmmikrosomen verzichtet. Statt dessen wurden Lebermikrosomen eingesetzt (2x gewaschen). Es zeigte sich, daß die schlechtere Glukuronidierung von Äthinylöstradiol nicht am Darmhomogenat, sondern in erster Linie am Substrat selbst lag. Naphthol wurde sowohl vom Darmhomogenat als auch in Lebermikrosomen gut glukuronidiert. Im ganzen Dünndarmbereich war die Glukuronidierung im Homogenat gleich. Damit dürfte sich die Naphtholglukuronidierung eignen, um pathologische Änderungen der Glukuronyltransferasen aus Dünndarmbi-

opsien des Menschen zu untersuchen.

Wir meinen, daß zwei der ausgewählten Versuchsmodelle in künftigen Untersuchungen weitere Anwendung finden werden. Einmal die isoliert perfundierte Darmschlinge, die sowohl über Resorption, als auch über Metabolisierung und polarisierte Abgabe der Metabolite ins Lumen, Informationen liefern kann. Außerdem dient die Darmschlinge als in vivo Modell zur Kontrolle des in vitro Systems. Zum anderen scheinen Darmzellen besonders gut geeignet zu sein, da sich Umsatzraten gut quantifizieren lassen, die zelluläre Kompartimentierung noch gut erhalten ist und Membrantransporte, die bei der Resorption mitspielen untersucht werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Äthinylöstradiol wird aus der isolierten Darmschlinge gut resorbiert. Aus der geschlossenen Darmschlinge werden innerhalb von 30min zwischen 46% und 74% in das Blut aufgenommen. Bei der perfundierten Darmschlinge etwa 53% aus dem Perfusat. Etwa 2% werden 2-hydroxyliert. 46% des resorbierten Äthinylöstradiols werden mit Glukuronsäure konjugiert (geschlossene Schlinge) und 2% mit Sulfat. Äthinylöstradiol wurde nach Konjugation auch ins Lumen abgegeben und im Lumen als Äthinylöstradiolsulfat angereichert. Außerdem erschien im Darmlumen ein nicht identifizierter Metabolit (8%). Äthinylöstradiol wird also während der Resorption kaum in hormonell inaktive Steroide umgewandelt. Allerdings könnte die Ausscheidung des Sulfatesters ins Lumen die Äthinylöstradiolresorption abschwächen.
Resorptionsgeschwindigkeit und Konjugation von Äthinylöstradiol waren nur in sehr geringem Maße abhängig von der Durchblutung. Unterschiede in der Glukuronidierungsrate in Abhängigkeit von der Magenentfernung wurden am Ganztier nicht festgestellt, im Darmhomogenat und an isolierten Darmsegmenten jedoch zeigte sich eine leicht erhöhte Glukuroniderungsrate im Bereich des mittleren Ileums. Resorption und Glukuronidierung von Äthinylöstradiol waren am Ganztier konzentrationsunabhängig, im Bereich zwischen 20nM und 2mM Äthinylöstradiol. Beim Äthinylöstradiol war die Aufnahme aus dem Darmlumen in die Darmwand wesentlich schneller, als die anschließende Konjugation. Beim Naphthol dagegen, hielt die Konjugationsgeschwindigkeit Schritt mit der Aufnahmegeschwindigkeit.

Die Naphtholkonjugation im isolierten Darmstück und im Darmhomogenat folgt den üblichen Regeln der Enzymkinetik. Dagegen weist Äthinylöstradiol ein ungewöhnliches kinetisches Verhalten auf. Bei Erhöhung der Menge an biologischem Material erhöht sich die Umsatzgeschwindigkeit nicht proportional. Auch die Erhöhung der Äthinyl-

östradiolkonzentration führt nicht zu einer proportionalen Beschleunigung des Umsatzes. Diese Ergebnisse haben zur Konsequenz, daß aus menschlichem Dünndarmbiopsiematerial die Konjugationsrate von Äthinylöstradiol nicht bestimmt werden kann.

Äthinylöstradiolglukuronid wurde mit etwa 1/20 der Geschwindigkeit von Äthinylöstradiol aus dem Darm resorbiert. Während der Resorption wurde das Konjugat zu einem kleinen Teil gespalten. Die Daten sprechen dafür, daß das Konjugat in unveränderter Form resorbiert werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung wurden folgende experimentelle Modelle vergleichend beurteilt:
Die isolierte Darmschlinge, der isolierte Darmsack, isolierte Darmstücke, isolierte Darmzellen und Darmhomogenat. Die isolierte Darmschlinge lieferte am meisten Information über Resorption, Wiederabgabe ins Darmlumen und Konjugation von Äthinylöstradiol. Im isolierten Darmsack wurden diese Bewegungen qualitativ nachgeahmt, jedoch lieferte dieses Modell keine wesentlichen zusätzlichen Erkenntnisse. Isolierte Darmstücke erwiesen sich als ungeeignetes experimentelles Modell. Die Glukuronidierungsrate im Darmhomogenat war nur im Falle von Naphthol, nicht aber im Falle von Äthinylöstradiol ein geeignetes Mittel zur Bestimmung der Aktivität der Glukuronyltransferasen. Schließlich lassen sich in isolierten Darmzellen die Konjugationsraten reproduzierbar und quantifizierbar messen. Damit bieten diese Zellen gute Voraussetzung für künftige Untersuchungen zum Membrantransport und intrazelluläre Metabolisierung von Östrogenen und Fremdsubstanzen im Darm.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) EGON DICFALUSY und CHRISTIAN LAURITZEN: Oestrogene beim Menschen. Springer Verlag, Berlin·Göttingen. Heidelberg, 960; 1512 (1961)

(2) Rote Liste, Hrsg: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, Frankfurt 1977/78

(3) NEUMANN, F. und SCHENK, B.: Endokrinpharmakologie,in: Pharmakologie und Toxikologie (Forth, Henschler, Rummel Hrsg.) Bibliographisches Institut, Mannheim· Wien·Zürich, 315 (1975)

(4) NORD DIETRICH: Pharma Dialog 59, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie, 8 (1979)

(5) FIESER, L. F. und FIESER, M.: Steroide, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr., 521 (1961)

(6) GELBKE, H. P., BALL, P. und KNUPPEN, R.: 2-Hydroxy-oestrogens chemistry, biogenesis, metabolism and physiological significance, in: Steroid biochemistry and pharmacology (Briggs, M. H. und Christie, G. A.), 81 (1977)

(7) HELTON, E. D. und GOLDZIEHER, J. W.: The pharmacokinetics of ethinyl etrogens. Contraception 15, NO. 3, 255-284 (1977)

(8) BOLT, H.: Metabolism of estrogens-natural and synthetic Pharmacol. Therap. 4, 155-181 (1979)

(9) REED, M. J., FOTHERBY, K. und STEELE, S. J.: Metabolism of ethynyloestradiol in man. J. Endocr. 55: 351-361 (1972)

(10) BACK, D.J., BATES, M. W., BRECKENRIDGE, A. M., FRANCESCA E. CRAWFORD, ORME, M. L`E, ROWE, P. H., SMILES, G. und SMITH, E.: Ethynylestradiol and norethindrone metabolism by everted sacs of rat ileum. Contraception 18, No. 2. 127-135 (1978)

(11) ULLRICH, V.: Die Rolle des Cytochrom p 450 bei der Aktivierung von Pharmaka. Arzneimittelforschung 27, 1821-1827 (1977)

(12) JOSTING, D., WINNE, D., BOCK, K. W.: Glucuronidation of paracetamol, morphine and 1-naphthol in the rat intestinal loop. Biochem. Pharmacol. 24, 859-862 (1975)

(13) HARTIALA, K.: Metabolism of hormones, drugs and other substances by the gut. Physiological Reviews 53, 496-534 (1973)

(14) BOLT, H. und KAPPUS, H.: Irreversible binding of ethynylestradiol metabolites to protein and nucleic acids as catalyzed by rat liver microsomes and mushroom tyrosinase. J-Steroid Biochem. 5, 179-184 (1974)

(15) OCHSENFARTH, H. und WINNE, D.: Der Einfluß der Durchblutung auf die Resorption von Arzneimitteln aus dem Jejunum der Ratte. Arch. Pharmac. 264, 55-75 (1969)

(16) CLARK, S. B. und NORUM, K. R.: Intestinal lymph chylomicron cholesteryl ester during duodenal triolein infusion at increasing rate. Scand. J. Gastroent. 13, 983-990 (1978)

(17) WEISER, M. M.: Intestinal epithelical cell surface membrane glycoprotein synthesis. I:An indicator of cellular differentiation. J. Biol. Chem. 248, 2536-2543 (1973)

(18) PALMER, R. H. und BOLT, M. D.: Bile acid sulfates I. synthesis of lithocholic acid sulfates and their identification in human bile. J. Lipid Res. 12, 671-679 (1971)

(19) JTTRICH, G.: Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der östrogenen Hormone im Harn. Hoppe Seyler`s Z. Physiol. Chem. 312, 1-7 (1958)

(20) SZARKOWSKA, L. und KLINGENBERG, M.: On the role of ubiquinone in mitochondria. Biochem. Z. 338, 674-697 (1963)

(21) LEOPOLD, G. : First-pass-Effekt. Drug Res. 27 (I), 241-245 (1977)

(22) GREENE, M. L., und SAUNDERS, D. R.: Metabolism of tetrahydrocannabinol by the small intestine. Gastroenterology 66, No.3, 365-372 (1974)

(23) REIDENBERG, M. M., DRAYER, D., De MARCO, A. L., BELLO, C. T.: Hydralazine elimination in man.

(24) BREYER, U. und WINNE, D.: Absorption and metabolism of the phenothiazine drug perazine in the rat intestinal loop. Biochem. Pharmacol. 26, 1275-1280 (1977)

(25) SCHWENK, M., FRANK, B. WINNE, D.: Absorption and metabolism of estrone and estrone sulfate in the rat intestine in vivo. Naunyn - Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 307, R 50 (1979)

(26) PEKAS, J. C.: Naphthol metabolism: Glucuronide conjugation and transport by the rat intestine in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, 404-419 (1974)

(27) MELI, A., CARGILL, D. I., GIANNINA, T., STEINETZ, B. G.: Studies on the transport of estrogens by the rat small intestine in vivo. proc. Soc. Biol. Expl. Med. 129, 937-944 (1968)

(28) HÖLLER, M., GROCHTMANN, W., NAPP, M., BREUER, H.: Studies on the metabolism of oetrone sulfate. Biochem. 166, 363-371 (1977)

(29) TROPL, R., BRECKWOLDT, M., HOFF, A.: Metabolism of ^{3}H-estrone sulfate in postmenopausal uterine tissue. Act. Endocrinol. 84, Suppl, 73 (1977)

(30) SCHWENK, M., LOPER del PINO, V., BOLT, H.: The kinetics of hepatocellular transport and metabolism of estrogens. J. Steroid Biochem. 10, 37-41 (1979)

(31) LÖFFLER, S. und BOLT, H. M.: Untersuchungen zum enterohepatischen Kreislauf von Östradiol und Äthinylöstradiol bei der Ratte. Arzneimittelforschung im Druck (1980)

(32) HÄNNINIEN, O., AITIO, A. und HARTIALA, K,: Gastrointestinal distribution of glucuronide synthesis and the relevant enzymes in the rat. Scand. J. Gastroent. 3, 461-464 (1968)

(33) EINO HIETANEN und MATTI LANG: Control of glucuronide biosynthesis in the gastrointestinal mucosa, in: Conjugation reactions in drug biotransformation (A. Aítio, editor) 399-407 (1978)

(34) CONNEY, A. H., PANTUCK, E. J., HSIAO, K. C., GARLAND, W. A., ANDERSON, K. E., ALVARES, A. P., und KAPPAS, A.: Enhanced phenacetin metabolism in human subjects fed charcoal-broiled beef, in: Clin. Pharmacol. Therap. 20 633-641 (1976)

(35) LAUTERBACH, F.: Intestinal secretion of organic ions and drugs, in: Intestinal permeation, 173-195 (1977)

(36) BARR, W. H. und RIEGELMAN, S. + : Intestinal drug absorption and metabolism II:Kinetic aspects. J.Pharmacol. Sci. 59, 164-168 (1970)

(37) KNAPSTEIN, P. und OERTEL, G. W.: Enterohepatischer Kreislauf von 7α-^{3}H-DHEA-^{14}C-Glukuronosid und 7α-^{3}H-DHEA-^{35}S-Sulfat beim Meerschweinchen. Experientia 22, 577-578 (1966)

(38) KNAPSTEIN, P., WENDELBERGER, F. und OERTEL? G. W.: Rekonjugation von [7α-^{3}H] Androstenolon-[^{14}C] glucuronid und freiem [7 -^{3}H] C_{19}-Steroid in Leber und Dünndarm des Menschen in vivo. Hoppe-Seyler'sZ. Physiol. Chemie, 348, 89-92 (1967)

(39) PARSONS, D. S.: Activation and inhibitation of intestinal absorption by drugs, in: Pharmacology of intestinal absorption: Gastrointestinal absorption

of drugs, I, Pergamon Press Oxford (1978)

(40) ZACKIM, D. und VESSEY, D. A.: Membrane-bound estrone as substrate for microsomal UDP-glucuronyltransferase J. Biol. Chem. 252, No 21, 7534-7637 (1977)

(41) PARSONS, D. S.: Methods for investigation of intestinal absorption, in: Handbook of physiology:Alimentary canal, III, Section 6, Intestinal Absorption, Washington, D. C., (1968)

(42) Pharmacology of intestinal absorption: Gastrointestinal absorption of drugs, in: International encyclopedia of pharmacology and therapeutics, I, Pergamon Press, Oxford (1978)

(43) HO, N. F. H., PARK, J. Y., AMIDON, G. E.: Methods for interrelating in vitro and in vivo methods, in: Gastrointestinal absorption of drugs. American Pharmaceutical Association, Washington, D. C., (1979)

(44) OCHSENFARTH, H.: The relevance of blood flow for the absorption of drugs in the vasculary perfused, isolated intestine of the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 306, 105-112 (1979)

(45) WINNE, D.: The influence of unstirred layers on intestinal absorption , in: Intestinal permeation (Lauterbach Hrsg.), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 58 (1977)

(46) KIMMICH, G. A.: Preparation and characterization of isolated intestinal epithelial cells and their use in studying intestinal transport. Methods in Membrane Biology, Bd 5, (Korn, e. Hrsg!), Plenum Press (NY) 51-115 (1975)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen in der Zeit von Oktober 1978 bis Oktober 1979 durchgeführt.
Herrn Prof. Dr. H. Remmer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Insbesondere Herrn Dr. M. Schwenk, der die Arbeit angeregt und in vielen Diskussionen stets gefördert hat, bin ich für diese Möglichkeit zu Dank verpflichtet.
Frau Brigitte Frank möchte ich für die Hilfe bei der Präparation meinen besonderen Dank sagen.

Lebenslauf

Am 26.10.1955 wurde ich, Jutta Carmen Schiemenz, als Tochter des Erwin und der Edeltraut Schiemenz, in Cottbus geboren. Von 1962 - 1963 besuchte ich die Volksschule in Ruchheim/Pfalz und von 1963 - 1966 die Volksschule in Walldorf/Hessen. Daraufhin wechselte ich über auf das Prälat-Diehl-Gymnasium in Groß-Gerau, wo ich am 7.5.1975 meine Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1975/76 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
Am 31. August 1977 bestand ich in Reutlingen die Ärztliche Vorprüfung. Nach Beendigung dieser Ärztlichen Vorprüfung bereitete ich mich auf den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor, die ich am 31. August 1978 bestand. Der 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung folgte am 3.9. 1981, und mit der 3. Ärztlichen Prüfung am 22.10.1982 beendete ich mein Studium.